

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK KASAR KLUWEK (*Pangium edule Reinw*) DENGAN METODE *MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION*
(Kajian Rasio Bahan:Pelarut dan Waktu Ekstraksi)**

SKRIPSI

Oleh:

RINANDA TRINOMINDAR PUTERI WARASARI

145100101111046



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK KASAR KLUWEK (*Pangium edule Reinw*) DENGAN METODE *MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION*
(Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Waktu Ekstraksi)**

SKRIPSI

Oleh:

RINANDA TRINOMINDAR PUTERI WARASARI

145100101111046

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknologi Pertanian**



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Tugas Akhir : Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kasar Kluwek
(*Pangium edule Reinw*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Waktu Ekstraksi)

Nama : Rinanda Trinomindar Puteri Warasari

NIM : 145100101111046

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I,



Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si
NIP. 19620612 198703 1 031

Tanggal Persetujuan :

Dosen Pembimbing II,



Sudarma Dita Wijayanti, STP, M.Sc, MP
NIK. 201201 840924 2 001

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Tugas Akhir : Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kasar Kluwek
(*Pangium edule Reinw*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Rasio Bahan:Pelarut dan Waktu Ekstraksi)

Nama : Rinanda Trinomindar Puteri Warasari

NIM : 1451001011111046

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,



Tunjung Mahatmanto, STP., M.Si., Ph.D
NIP. 19810908 200801 1 007

Dosen Penguji II,



Sudama Dita W., STP, M.Sc, MP
NIK. 201201 840924 2 001

Dosen Penguji III,



Dr.Ir. Joni Kusnadi, M.Si
NIP.19620612 198703 1 031



Ketua Jurusan,

Prof.Dr.Teti Estiasih, STP., MP.
NIP. 19701226 200212 2 001

Tanggal Lulus TA :

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa : Rinanda Trinomindar Puteri Warasari
NIM : 145100101111046
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul Skripsi : Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kasar Kluwek
(*Pangium edule Reinw*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Waktu Ekstraksi)

Menyatakan bahwa,

Skripsi dengan judul di atas merupakan karya asli penulis serta Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si. dan Sudarma Dita Wijayanti, STP., M.Sc, MP selaku dosen pembimbing. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang,

Pembuat Pernyataan,

Rinanda Trinomindar Puteri Warasari
NIM 145100101111046

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Pelaihari (Kalsel), 12 November 1995 dari Ayah yang bernama Rianto (alm) dan Ibu Nurul Ainy (almh). Penulis merupakan anak bungsu dari tiga bersaudari. Penulis menyelesaikan pendidikan formal di SD Negeri Nogosari Pandaan, Pasuruan pada tahun 2008. Kemudian melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 1 Pandaan, Pasuruan pada tahun 2011. Dan pada tahun 2014 menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMA Negeri 1 Pandaan, Pasuruan. Penulis kemudian melanjutkan ke Perguruan Tinggi dengan jalur SNMPTN di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Minat Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.

Selama menempuh kuliah di Perguruan Tinggi, penulis aktif mengikuti beberapa seminar baik nasional maupun internasional dan mengikuti kepanitiaan diantaranya Ospek Jurusan Teknologi Hasil Pertanian pada bagian divisi pendamping. Penulis Pernah mengikuti Praktek Kerja Lapang (PKL) pada bulan Januari 2017 di Direktorat Standardisasi Pangan, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta Pusat.

Rinanda Trinomindar Puteri Warasari. 145100101111046. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Kluwek (*Pangium edule Reinw*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Rasio Bahan:Pelarut dan Waktu Ekstraksi). Tugas Akhir. Pembimbing I: Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si. Pembimbing II: Sudarma Dita Wijayanti, STP, M.Sc, MP

RINGKASAN

Kluwek (*Pangium edule*) merupakan biji tanaman pangi yang terfermentasi secara alami dan sering digunakan dalam pembuatan rawon. Kluwek mengandung beberapa senyawa bioaktif salah satunya antioksidan alami yang dapat menetralkan radikal bebas. Senyawa bioaktif pada kluwek dapat diekstrak dari tanaman menggunakan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE), yaitu metode ekstraksi dengan bantuan gelombang elektromagnetik. Faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi, salah satunya adalah rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi dengan metode MAE terhadap aktivitas antioksidan pada biji kluwek.

Metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial. Faktor pertama yaitu rasio bahan:pelarut yang terdiri dari 3 level (1:5, 1:10, 1:15 b/v) dan faktor kedua yaitu lama waktu ekstraksi yang terdiri dari 3 level (10, 15, 20 menit), sehingga didapatkan 27 satuan percobaan. Analisis ekstrak kluwek meliputi rendemen, total fenol, total flavonoid, total tanin dan aktivitas antioksidan (IC_{50}). Perlakuan terbaik ditentukan dengan metode *Zeleny*. Data dianalisa menggunakan analisis sidik ragam atau ANOVA (*Analysis of Variance*) dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) atau BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Hasil penelitian pada kluwek didapatkan hasil kadar air sebesar 54,15%, total fenol 1,26 mg GAE/g, total flavonoid 0,12 mg QE/g, total tanin 1,25 mg TAE/g dan aktivitas antioksidan IC_{50} sebesar 60119,60 ppm. Sedangkan untuk ekstrak kluwek didapatkan perlakuan terbaik pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit. Hasil rendemen didapatkan sebesar 80,30%, total fenol 3,90 mg GAE/g ekstrak, total flavonoid 0,56 mg QE/g ekstrak, total tanin 1,62 mg TAE/g ekstrak dan nilai IC_{50} sebesar 36228,99 ppm.

Kata Kunci : Antioksidan, Ekstraksi, Kluwek, *Microwave Assisted Extraction*

Rinanda Trinomindar Puteri Warasari. 145100101111046. Antioxidant Activity in Kluwek Extract (*Pangium edule Reinw*) with Microwave Assisted Extraction Method (Study of Materials:Solvents Ratio and Extraction Time . TA. Supervisor I: Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si. Supervisor II: Sudarma Dita Wijayanti, STP, M.Sc, MP

SUMMARY

Kluwek (*Pangium edule*) is a seed of pangi plants that have been naturally fermented and often used as a spice in making *rawon*. Kluwek contains several bioactive compounds, one of which is natural antioxidants that can neutralize free radicals. Bioactive compounds in kluwek can be extracted from plants using Microwave Assisted Extraction (MAE), which is an extraction method using electromagnetic waves. The factors that influence the extraction results are the materials : solvents ratio and extraction time. The aim of this study was to determine the effect of the materials : solvents ratio and extraction time againts antioxidant compounds of kluwek by using microwave as MAE as extraction method.

The research method used was factorial randomized block design. The first factor was the ratio of materials : solvents with 3 levels (1:5, 1:10, 1:15 b/v) and the second factor was extraction time with 3 levels (10, 15, 20 minutes). Analysis conducted in Kluwek extracts were total yield, total phenols, flavonoids content, tannin content and antioxidant activity (IC_{50}). The best treatment selection was conducted using Zeleny method. The data were analyzed using analysis of variance or ANOVA and continued with further test DMRT (Duncan Multiple Range Test) or BNT (Smallest Significant Difference) with confidence interval of 95% ($\alpha = 0.05$).

The best treatment obtained was water content 54.15%, total phenol 1.26 mg GAE/g, flavonoids content 0.12 mg QE/g, tannin content 1,25 mg TAE/g and antioxidant activity (IC_{50}) 60119.60 ppm. Whereas for the extraction method of MAE obtained the best treatment, in the treatment of materials: solvents ratio 1:5 and extraction time 20 minutes. Results yield 80,30%, total phenol 3.90 mg GAE/g extract, flavonoids content 0.56 mg QE/g extract, tanin content 1.62 mg TAE/g extract and IC_{50} 36228.99 ppm.

Keywords: Kluwek, Antioxidant, Extraction, *Microwave Assisted Extraction*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kasar Kluwek (*Pangium edule Reinw*) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Waktu Ekstraksi)**”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

Skripsi ini dapat terselesaikan karena dukungan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr.Ir. Joni Kusnadi, M.Si dan Ibu Sudarma Dita Wijayanti, STP, M.Sc. MP. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, ilmu pengetahuan serta dukungan kepada penulis
2. Ibu Freini Dessi Effendi, STP, MP selaku dosen pembimbing proyek yang telah memberikan bimbingan, arahan, ilmu pengetahuan serta dukungan kepada penulis
3. Tunjung Mahatmanto STP., M.Si., Ph.D selaku dosen penguji yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan laporan tugas akhir
4. Kakak tercinta (Rinanda Jusika, Rinanda Dwifebrisa, mas Fai, mas Yusuf), Bu Nur, Ayah Singgih, para om dan tante, serta semua keluarga lainnya yang telah memberikan doa, dorongan dan dukungan baik moral maupun materil
5. Prof. Dr. Teti Estiasih, STP., MP selaku ketua jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya
6. Kharisma Dewi A. dan Eunike Debora atas kerja sama, dukungan serta semangat selama melaksanakan penelitian
7. Odilia Inneke (teman susah dan senang selama empat tahun ini), atas dukungan, doa, dorongan dan bantuannya
8. Para laboran, yang telah membimbing dan membantu selama penelitian di laboratorium

9. Grup Keluarga Haran 18+ (Rika, Kharisma, Yanisa, Enno, Yvette, Gadis, Devina dan Sonya), atas doa, dukungan, dorongan, penghiburannya dan bantuannya
10. Teman-teman THP angkatan 2014 atas bantuan, dukungan serta semangat kepada penulis
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, atas bantuannya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan baik

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Tugas Akhir ini masih ada kekurangan. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan Tugas Akhir ini

Malang, Oktober 2018

Penulis

DAFTAR ISI

SAMPUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	iv
RIWAYAT HIDUP	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
1.5 Hipotesa	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pangi	4
2.2 Kluwek	6
2.3 Ekstraksi	8
2.3.1 <i>Microwave Assisted Extraction</i>	11
2.3.2 Pelarut	15
2.4 Antioksidan	16
2.4.1 Antioksidan Pada Kluwek	19
2.4.2 Fenol	19
2.4.3 Flavonoid	20
2.4.4 Tanin	22
2.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan metode DPPH	23

2.4.6 Nilai IC_{50} (<i>Inhibition Concentration</i>).....	24
III. METODOLOGI PERCOBAAN	26
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	26
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	26
3.2.1 Alat	26
3.2.2 Bahan	26
3.3 Metode Penelitian	27
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	28
3.4.1 Persiapan Sampel.....	29
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kluwek (Modifikasi dari Sukaryo, 2016).....	30
3.5 Analisa Senyawa	30
3.6 Analisa Data.....	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Analisis Bahan Baku	33
4.2 Rendemen	35
4.3 Total Fenol.....	38
4.4 Total Flavonoid	43
4.5 Total Tanin.....	46
4.6 Nilai IC_{50}	49
4.7 Korelasi Antara Senyawa Bioaktif dan Nilai IC_{50}	53
4.8 Perlakuan Terbaik.....	57
V. KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA.....	62
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
Tabel 2. 1.	Kandungan Gizi Daging Biji Pangi Segar per 100 gram Kandungan Jumlah (gram)	8
Tabel 2. 3	Perbedaan Metode Ekstraksi Konvensional dan Modern	12
Tabel 2. 4.	Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya	16
Tabel 3. 1.	Kombinasi Perlakuan Dua Faktor	27
Tabel 3. 2.	Data Hasil Penelitian Pendahuluan	28
Tabel 4. 1.	Perbandingan Hasil Analisis Bahan Baku	33
Tabel 4. 2.	Rerata Rendemen Ekstrak Kluwek Akibat Perlakuan Rasio bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi	37
Tabel 4. 3.	Rerata Total Fenol Ekstrak Kluwek Akibat Perlakuan Rasio bahan: pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi	40
Tabel 4. 4.	Rerata Total Flavonoid Akibat Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut	44
Tabel 4. 5.	Rerata Total Tanin Akibat Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi	47
Tabel 4. 6.	Rerata Nilai IC_{50} Akibat Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi	52
Tabel 4. 7.	Korelasi senyawa bioaktif dengan nilai IC_{50}	55
Tabel 4. 8.	Interpretasi Nilai r	55
Tabel 4. 9.	Hasil Penentuan Perlakuan Terbaik Ekstraksi Kluwek	57
Tabel 4. 10.	Perbandingan Ekstrak Kluwek dengan Kluwek Segar	58

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
Gambar 2.1	(1) Pohon Pangi; (2) Batang Pangi; (3) Akar Banir Pangi; (4) Daun Pangi	5
Gambar 2.2	(1) Buah Pangi, (2) Biji Pangi yang Masih Muda (3) Biji Pangi yang Sudah Tua (kluwek)	7
Gambar 2.3	Struktur Kimia Fenol.....	20
Gambar 2.4	Struktur Kimia Flavonoid	22
Gambar 2.5	Konversi radikal bebas DPPH oleh antioksidan.....	24
Gambar 3.1	Diagram Alir Proses Ekstraksi Kluwek.....	32
Gambar 4.1	Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Kluwek.....	36
Gambar 4.2	Pengaruh perlakuan rasio bahan: pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap total fenol ekstrak kluwek.....	39
Gambar 4.3	Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rerata Total Flavonoid Ekstrak Kluwek.....	43
Gambar 4.4	Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rerata Total Tanin Ekstrak Kluwek	46
Gambar 4.5	Pengaruh perlakuan rasio bahan: pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap rerata nilai IC_{50} ekstrak kluwek.....	50
Gambar 4.6	Grafik Total Fenol, Total Flavonoid, Total Tanin dan Nilai IC_{50}	54

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
Lampiran 1.	Prosedur Analisa.....	72
Lampiran 2.	Data Analisa Bahan Baku Daging Biji Kluwek	77
Lampiran 3.	Data Analisis Rendemen Ekstrak Kluwek.....	78
Lampiran 4.	Data Analisis Total Fenol Ekstrak Kluwek	80
Lampiran 5.	Data Analisis Total Flavonoid Ekstrak Kluwek.....	82
Lampiran 6.	Data Analisis Total Tanin Ekstrak Kluwek	84
Lampiran 7.	Data Analisis Aktivitas Antioksidan (IC_{50}) Ekstrak Kluwek	86
Lampiran 8.	Korelasi Senyawa Bioaktif Terhadap Aktivitas Antioksidan (IC_{50}) Kluwek	101
Lampiran 9.	Analisis Perlakuan Terbaik Metode Zeleny.....	103
Lampiran 10.	Data Hasil Penyetaraan atau Pengkonversian Ekstrak dalam Berat Sampel	106
Lampiran 11.	Dokumentasi Penelitian.....	110

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kluwek (*Pangium edule*) merupakan biji buah pangi yang telah difermentasi untuk menghilangkan kadar asam sianidanya. Proses fermentasi ini, menyebabkan daging biji kluwek mengalami pembusukan dan mengubah warnanya menjadi coklat kehitaman dan berlemak. Di Indonesia kluwek seringkali digunakan sebagai bumbu masakan seperti rawon (Gardjito, 2013). Kluwek diduga mengandung senyawa bioaktif yang dapat berfungsi sebagai antioksidan alami. Hal ini dikarenakan menurut Abdullah (2012), bibit pangi mengandung beberapa metabolit sekunder seperti glikosida sianogen dan berbagai alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, tanin, dan kuinon. Menurut penelitian Makaganza *et.al* (2015), menjelaskan ekstrak akuades metode maserasi dari biji pangi ditemukan mengandung total fenolik sebesar 113,367 mg/kg dan tanin terkondensasi sebesar 26,744 mg/kg. Menurut Suryanto dan Wehantouw (2009), golongan senyawa fenolik seperti senyawa fenolik sederhana, flavonoid dan tannin dapat berfungsi sebagai antioksidan alami.

Antioksidan dalam tubuh berfungsi untuk melindungi sistem biologis tubuh dari hal-hal merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi yang menyebabkan oksidasi berlebih akibat dari radikal bebas (Hariyatmi, 2004). Adanya radikal bebas dapat menimbulkan reaksi berantai yang mampu merusak struktur sel yang apabila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Inggrid dan Santoso, 2014). Mengingat pentingnya peran antioksidan, maka perlu dilakukan proses ekstraksi dan uji aktivitas antioksidan pada bahan yang memiliki kandungan antioksidan alami salah satunya pada kluwek.

Salah satu cara ekstraksi untuk mendapatkan senyawa antioksidan alami adalah dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE), yaitu metode ekstraksi dengan menggunakan bantuan gelombang mikro. Penggunaan MAE diharapkan dapat mempercepat waktu ekstraksi dan meningkatkan senyawa antioksidan. Metode MAE juga dapat membantu meningkatkan jumlah rendemen ekstrak kasar dalam waktu ekstraksi dan jumlah pelarut yang lebih rendah dibanding dengan metode ekstraksi konvensional (Langat, 2011).

Volume pelarut merupakan salah satu faktor kritis dalam proses ekstraksi. *Volume* pelarut harus mencukupi agar dapat dipastikan bahwa bahan telah tercelup seluruhnya ke dalam pelarut selama proses iradiasi berlangsung (Mandal *et al.*, 2007). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades. Pemilihan ini didasarkan pada sifatnya yang polar sesuai dengan beberapa jenis antioksidan dalam kluwek yang bersifat polar dan juga akuades memiliki nilai konstanta dielektrik tinggi (Renhoran, 2012). Selain itu, waktu juga merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap hasil ekstrak yang didapat. Umumnya, dengan meningkatnya waktu ekstraksi, jumlah senyawa target dan rendemen meningkat, walaupun terdapat resiko terjadinya degradasi senyawa target itu sendiri. Akan tetapi, waktu ekstraksi sangat tergantung pada bahan yang diekstrak (Mandal *et al.*, 2007). Hal tersebut yang mendasari diperlukannya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh rasio bahan:pelarut dan waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada kluwek, agar didapatkan ekstrak kasar kluwek yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi.

1.2 Rumusan Masalah

Perumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)?
2. Bagaimana interaksi rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)?
3. Bagaimana korelasi antara senyawa bioaktif dan nilai IC_{50} pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)?

1.3 Tujuan

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)

2. Mengetahui interaksi rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)
3. Mengetahui korelasi antara senyawa bioaktif dan nilai IC₅₀ pada ekstrak kasar kluwek dengan menggunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE)

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi mengenai kadar senyawa bioaktif yang terkandung dalam biji kluwek dan bagaimana pengaruhnya terhadap aktivitas antioksidan
2. Memberikan informasi pada lembaga akademis mengenai pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi metode *microwave assisted extraction* (MAE) dalam mengekstrak senyawa antioksidan
3. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai aktivitas antioksidan dari ekstrak kluwek sehingga dapat digunakan sebagai antioksidan alami
4. Dapat dijadikan pertimbangan sebagai alternatif dalam pengembangan obat-obat alami sebagai pencegahan berbagai penyakit degeneratif yang disebabkan radikal bebas

1.5 Hipotesa

1. Diduga rasio bahan:pelarut 1:5,1:10,1:15 dan lama waktu ekstraksi 10, 15, 20 menit akan berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek yang dihasilkan melalui metode ekstraksi *microwave assisted extraction* (MAE)
2. Diduga terdapat interaksi antara rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kluwek yang dihasilkan melalui metode ekstraksi *microwave assisted extraction* (MAE)
3. Diduga terdapat korelasi antara senyawa bioaktif dan nilai IC₅₀ pada ekstrak kasar kluwek yang dihasilkan melalui metode ekstraksi *microwave assisted extraction* (MAE)

II. TINJAUAN PUSTAKA

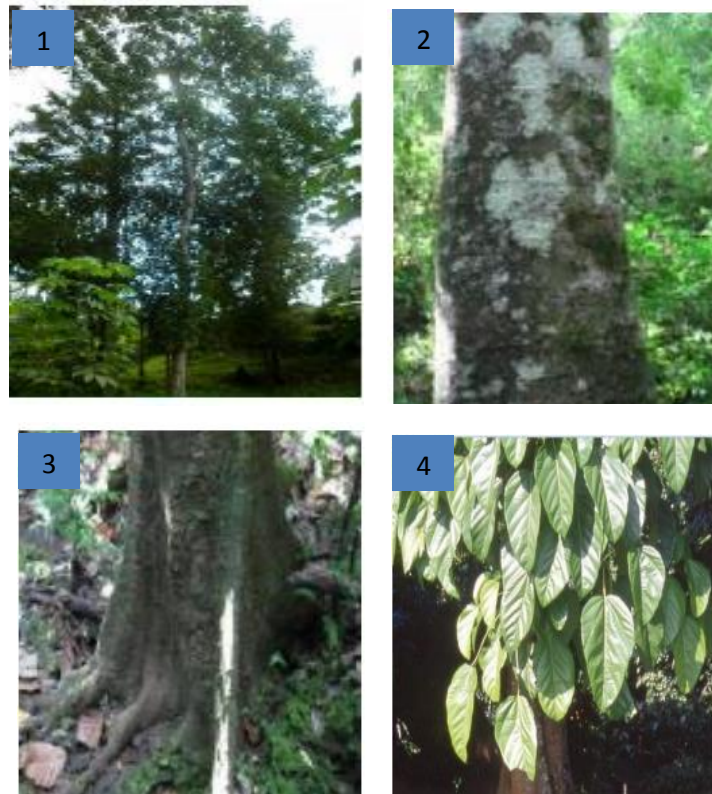
2.1 Pangi

Pangi dikenal dengan nama botani *Pangium edule Reinw*, merupakan jenis tanaman berkeping dua (*dicotyledonae*). Pangi adalah tanaman berbatang keras yang termasuk dalam famili *Flacouritaceae*. Pemanfaatan tanaman ini secara umum berkaitan dengan kegunaan bijinya sebagai salah satu bumbu masakan (Gardjito, 2013). Pangi memiliki sebutan yang berbeda pada tiap daerah, seperti Kepayang (Sumatera); pucung, picung (Sunda); pangi, kluwek (Jawa); pakem (Madura); kalowa (Sumbawa); kapayang, lapencuang, kapecong, simaung (Minangkabau); pangi (Melayu, Bali dan Bugis); dan palopo (Bugis) (Hidayat dan Napitupulu, 2015). Menurut Arini (2012), tanaman Pangi memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Dilleniidae</i>
Ordo	: <i>Violales</i>
Famili	: <i>Flacourtiaceae</i>
Genus	: <i>Pangium</i>

Pangi merupakan tanaman berbentuk pohon, tingginya mencapai 40 m, kanopi lebat dan diameter batangnya mencapai 2,5 m. Daun pangi merupakan daun tunggal yang tersusun spiral dengan bentuk bulat telur hingga menjantung. Panjang daunnya 12-30 cm, berwarna hijau gelap yang mengilap pada permukaan bagian atasnya dan memiliki panjang tangkai daun 7-30 cm. Sedangkan bunganya berbentuk tandan dan berbau harum. Tumbuhan ini mulai berbuah secara terus-menerus sepanjang musim mulai umur 15 tahun (Nisa, 2013). Buah pangi berbentuk bulat telur 15-25 cm menggantung pada tangkai yang melengkung dan berwarna coklat. Bijinya keras, hampir bersudut tiga dilapisi daging putih dan beraroma (Hidayat dan Napitupulu, 2015). Batang

pokoknya besar, ranting muda berambut (berbulu) dan berwarna abu-abu. Kulit kayu kluwek berwarna kemerahan atau abu-abu kecokelatan dan kadang-kadang kasar dengan banyak celah yang mengeras (Heriyanto dan Subiandono, 2008). Morfologi pohon pangi dapat dilihat pada gambah dibawah ini.



Gambar 2. 1. (1) Pohon Pangi; (2) Batang Pangi; (3) Akar Banir Pangi; (4) Daun Pangi (Wulandari, 2011)

Pohon pangi memiliki berbagai manfaat seperti kayu pohon pangi dapat digunakan untuk membuat batang korek api. Daun pangi dapat digunakan sebagai obat cacing (Hidayat dan Napitupulu, 2015). Selain itu, daun pangi yang masih muda oleh orang manado sering dimanfaatkan sebagai sayur kering sedangkan buahnya yang masih muda digunakan sebagai bumbu pepes (Gardjito, 2013). Biji pangi yang difermentasi semenjak dulu telah banyak dimanfaatkan sebagai bumbu dalam masakan rawon. Biji pangi yang mengandung lemak jika difermentasi akan menghasilkan lemak siklik tidak jenuh yaitu asam hidrokarpat, khaulmograd dan goulat (Arini, 2012). Biji pangi juga

dapat digunakan sebagai antiseptik dan dapat dihaluskan untuk menghilangkan kutu pada kerbau. Selain itu, biji pangi dapat digunakan sebagai pengganti minyak kelapa dan sebagai pengawet ikan. Asam sianida biji pangi akan mengawetkan ikan selama enam hari (Hidayat dan Napitupulu, 2015).

Saat ini, pangi juga dapat digunakan sebagai insektisida untuk melawan kutu kepala, sebagai obat serangga dan rayap. Selain itu, pohon pangi merupakan tumbuhan keras yang dapat berfungsi menahan erosi pada lahan-lahan kritis. Pohon pangi dibudidayakan dan ditanam sebagai pohon pelindung dan penghijauan di daerah aliran sungai (Arini, 2012). Kulit kayu atau biji pangi yang masih muda memiliki manfaat sebagai racun ikan. Tempurung pangi dapat dimanfaatkan sebagai media karbon aktif yang dapat menurunkan konsentrasi senyawa organik khususnya fenol (Arini, 2012). Namun pemanfaatan pangi masih belum banyak ditemukan kecuali pemanfaatan biji pangi menjadi bumbu masakan. Selain itu pemanfaatan biji pangi terfermentasi (kluwek) sebagai sumber antioksidan juga belum banyak diteliti.

2.2 Kluwek

Kluwek adalah biji tanaman pangi (*Pangium edule Reinw*) terfermentasi, yang merupakan produk pangan berupa biji keras berwarna kelabu, dengan daging licin berlemak dan berwarna kehitaman (Aprianti, 2011). Biji pangi mengandung asam sianida sehingga memerlukan penanganan tertentu sebelum dikonsumsi. Asam sianida pada biji pangi ini biasanya dihilangkan dengan cara menyimpan buah pangi yang telah masak selama 10-14 hari hingga kulit buahnya membusuk. Kemudian biji kluwek dipisahkan, dicuci dan direbus. Biji yang telah direbus kemudian ditimbun atau dikubur di dalam tanah selama 40 hari, setelah itu biji dikeluarkan dan dicuci. Kemungkinan adanya fermentasi selama ditimbun menjadikan daging biji pangi mengalami pembusukan alamiah sehingga warnanya berubah menjadi coklat kehitaman dan berlemak (Gardjito, 2013).

Pada biji pangi terdapat inti biji (*endosperm*) yang banyak mengandung lemak. Buah yang masih segar, endospermanya berwarna putih, apabila buah sudah disimpan dalam waktu yang lama, maka warna endosperma berubah menjadi kehitaman. Daging biji mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin dan sianida. Adanya tanin menyebabkan daging biji pangi

menjadi berwarna coklat. Reaksi tersebut dikenal dengan *browning enzymatic*, yang terjadi jika dikatalisis oleh enzim polifenolase dengan substrat berupa senyawa fenolik. Antara endosperma dengan tempurung dibatasi oleh selaput tipis berwarna coklat. Kulit biji kasar dengan perikarp setebal 6-10 mm, berkayu dan beralur (Aprianti, 2011). Daging biji kluwek biasa digunakan untuk memberi rasa gurih dan memekatkan warna kuah pada masakan menjadi warna coklat kehitaman, seperti rawon, brongkos dan sambal kluwek. Kluwek yang digunakan sebagai bumbu masakan, harus dipilih kluwek yang telah masak yang ditandai dengan suara biji yang terguncang bila digoyang-goyangkan (Gardjito, 2013). Kenampakan biji pangi dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2. 2. (1) Buah Pangi, (2) Biji Pangi yang Masih Muda (Sumber : Aprianti, 2011)
(3) Biji Pangi yang Sudah Tua (kluwek) (Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2018)

Semua bagian dari pohon pangi baik itu daun, batang maupun buah memiliki sifat racun karena adanya kandungan asam sianida yang tinggi. Namun, diantara beberapa bagian tanaman tersebut, biji muda pangi merupakan bagian yang paling beracun karena banyaknya kandungan senyawa ginokardin yang termasuk dalam senyawa glikosida hidrosianik. Di dalam tanaman, senyawa ginokardin selalu disertai oleh enzim ginokardase yang berfungsi menghidrolisis ginokardin untuk menghasilkan asam hidrosianik (Yunita, 2004). Biji pangi yang lebih tua mengandung ginokardin yang lebih sedikit dibandingkan dengan biji yang lebih muda. Setelah biji matang, jumlah glikosida berkurang dan pertumbuhan bijinya berhenti (Elidahanum, 2000). Kandungan sianida tertinggi terdapat dalam biji yaitu rata-rata lebih dari 2.000 ppm, diikuti oleh buah, daun, batang dan akar (Yuningsih dan Kartina, 2007).

Menurut Saputra (2001), di dalam kluwek terkandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan kuinon. Senyawa triterpenoid diketahui juga

terkandung dalam daging biji kluwek (Setyawan, 2004). Biji pangi mengandung minyak/lemak yang tinggi, dua kali lipat kandungan protein maupun karbohidratnya, seperti yang terlihat pada tabel berikut 2.1

Tabel 2. 1. Kandungan Gizi Daging Biji Pangi Segar per 100 gram Kandungan Jumlah (gram)

Kandungan	Jumlah (gram)
Air	51,0
Protein	10,0
Karbohidrat	13,5
Lemak/minyak	24,0
Kalsium (ca)	0,040
Phosphor (P)	0,10
Besi (Fe)	0,002
Vitamin B1	0,00015
Vitamin C	0,03
Energi (kal/gram)	2,73

sumber: Aprianti, 2011

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan bahan (Berk, 2018). Menurut Leba (2017), Ekstraksi adalah teknik pemisahan untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa-senyawa dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam pelarut non polar (*like dissolve like*) (Khopkar, 2008). Ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk menarik komponen yang diinginkan dari suatu bahan agar dapat dipisahkan (Renhoran, 2012).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, ukuran partikel, dan jenis pelarut. Jenis pelarut yang digunakan harus memperhatikan daya kelarutan, titik didih, sifat toksik, serta sifat mudah tidaknya terbakar (Renhoran, 2012). Ketika melakukan ekstraksi, pemilihan metode ekstraksi yang akan digunakan untuk mengisolasi suatu senyawa dari

bahan alam tergantung pada tekstur, kandungan senyawa, dan sifat senyawa yang diisolasi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti sokletasi, maserasi, dan perkolasi (Sibuea, 2015). Berdasarkan fase yang terlibat, ekstraksi dapat dibagi menjadi dua macam yaitu :

1) Ekstraksi cair-cair (*liquid extraction*)

Ekstraksi cair-cair atau disebut juga ekstraksi pelarut merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada fenomena distribusi atau partisi suatu analit antara dua pelarut yang tidak saling campur. Ekstraksi ini dilakukan untuk mendapatkan suatu senyawa dari campuran berfasa cair dengan pelarut lain yang juga berfasa cair. prinsip dasar pemisahan ini adalah perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam dua pelarut yang berbeda. Pada ekstraksi ini, alat yang digunakan adalah corong pisah. Corong pisah adalah alat yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam suatu campuran antara dua fasa pelarut dengan densitas berbeda yang tidak saling campur. Beberapa metode ekstraksi yang terdapat dalam metode ekstraksi cair-cair adalah ekstraksi tunggal dan ekstraksi berulang (Leba, 2017).

2) Ekstraksi padat-cair

Ekstraksi padat-cair atau leaching merupakan proses transfer secara difusi analit dari sampel berwujud padat ke dalam pelarutnya. Ekstraksi dari sampel padatan dapat dilakukan jika analit yang diinginkan dapat larut dalam pelarut pengestraksi. Pada ekstraksi ini, prinsip pemisahan didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu. Sehingga pelarut yang digunakan harus mampu menarik komponen analit dari sampel secara maksimal. Berdasarkan metode yang digunakan, ekstraksi padat-cair dibedakan menjadi maserasi, perkolasi dan sokletasi (Leba, 2017).

Sedangkan menurut Darwis (2000), metode ekstraksi terbagi menjadi dua yaitu metode ekstraksi konvensional dan modern. Metode ekstraksi konvensional yang umum digunakan antara lain:

a) Maserasi

Maserasi merupakan jenis ekstraksi padat cair paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari sambil diaduk sesekali

untuk mempercepat proses pelarutan analit. Kelebihan ekstraksi ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Kelemahannya adalah menggunakan banyak pelarut (Leba, 2017).

b) Perkolasi

Perkolasi merupakan jenis ekstraksi padat cair yang dilakukan dengan jalan mengalirkan pelarut secara perlahan pada sampel dalam suatu perkolator. Pada ekstraksi jenis ini, pelarut ditambahkan secara terus-menerus sehingga proses ekstraksi selalu dilakukan dengan pelarut baru. Pola penambahan pelarut yang dilakukan adalah menggunakan pola penetesan pelarut dari bejana terpisah disesuaikan dengan jumlah pelarut yang keluar atau dilakukan dengan penambahan pelarut dalam jumlah besar secara berkala (Leba, 2017).

c) Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dan adanya pendingin balik. Ekstraksi dapat berlangsung dengan efisien dan senyawa dalam sampel secara lebih efektif dapat ditarik oleh pelarut (Susanti dan Bachmid, 2016).

d) Soxhletasi

Sokletasi merupakan ekstraksi dengan menggunakan alat soklet. Sokletasi dilakukan dengan cara pemanasan pelarut. Uap pelarut yang dihasilkan mengalami pendinginan dalam kondensor dan secara kontinyu akan membasahi sampel dan secara teratur pelarut tersebut dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa analit. Proses ini berlangsung secara kontinyu. Pelarut dapat diuapkan kembali dan dipisahkan dari analit sehingga akan diperoleh ekstrak. Pada ekstraksi ini biasanya digunakan pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah (Leba, 2017).

Metode ekstraksi yang paling umum digunakan adalah maserasi dan sokhlet. Kekurangan dari metode tersebut yaitu memerlukan waktu ekstraksi yang lama juga membutuhkan sampel dan pelarut yang banyak. Saat ini mulai banyak digunakan metode *microwave assisted extraction* (MAE). Ekstraksi

dengan MAE ini dapat meningkatkan kecepatan transfer massa zat terlarut dari matriks (Mandal *et al.*, 2007).

2.3.1 *Microwave Assisted Extraction*

Microwave Assisted Extraction (MAE) merupakan metode ekstraksi yang memanfaatkan gelombang mikro. Ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro merupakan proses ekstraksi yang memanfaatkan energi gelombang mikro dengan frekuensi 0,3–300 GHz dalam bentuk radiasi non-ionisasi elektromagnetik (Delazar *et al.*, 2012). Energi gelombang mikro menyebabkan pergerakan molekuler dengan cara migrasi ion dan rotasi dipol. Pergerakan yang sangat cepat ini menghasilkan friksi atau gesekan yang akhirnya menghasilkan energi panas dalam bahan sehingga dinding sel maupun jaringan bahan akan rusak, dan *solute* akhirnya dapat keluar (Delazar *et al.*, 2012). Radiasi gelombang mikro membantu untuk mempercepat ekstraksi selektif melalui pemanasan pelarut secara cepat dan efisien (Jain *et al.*, 2009). Menurut beberapa hasil penelitian, MAE meningkatkan efisiensi dan efektifitas ekstraksi bahan aktif berbagai jenis rempah-rempah, tanaman herbal, dan buah-buahan (Calinescu *et al.*, 2001). Gelombang mikro mengurangi aktivitas enzimatis yang merusak senyawa target (Salas *et al.*, 2010).

Prinsip ekstraksi menggunakan gelombang mikro adalah radiasi gelombang mikro akan memberikan panas pada air dalam sel sehingga air dalam sel akan menguap dan memberikan tekanan tinggi pada dinding sel yang mengakibatkan sel bahan menjadi bengkak (*swelling*). Tekanan tersebut akan mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut (Mandal *et al.*, 2007). Rusaknya matrik bahan dapat mempermudah keluarnya senyawa-senyawa aktif dari dalam sel bahan ke pelarut di sekitarnya (Jain *et al.*, 2009). Menurut Kurniasari (2008), pemanasan gelombang mikro terjadi melalui interaksi langsung antara material dengan gelombang mikro. Interaksi langsung ini mengakibatkan pergerakan molekul yang menciptakan panas seiring dengan timbulnya gesekan antar molekul. Gesekan ini menyebabkan dinding sel maupun jaringan bahan akan rusak dan solut dapat keluar, sehingga semakin lama gesekan molekul terjadi maka semakin banyak pula energi yang terserap oleh bahan sehingga solut akan banyak keluar. Namun waktu paparan yang terlalu

lama harus dihindari agar mencegah terjadinya degradasi senyawa hasil ekstraksi (Chan *et al.*, 2011).

MAE cocok digunakan dalam pengambilan senyawa yang bersifat termolabil karena memiliki kontrol terhadap temperatur yang lebih baik dibandingkan proses pemanasan konvensional (Purwanto, 2010 dalam Ulinuha, 2014). Keuntungan menggunakan metode MAE adalah aplikasi penggunaannya luas dalam mengekstrak berbagai senyawa termasuk senyawa yang labil terhadap panas. Selain itu, laju ekstraksi yang lebih tinggi, konsumsi pelarut yang lebih rendah, dan pengurangan waktu ekstraksi yang signifikan dibanding ekstraksi konvensional merupakan keuntungan lain yang dimiliki MAE (Santos-Buelga *et al.*, 2012). Beberapa jenis bahan dapat diekstrak secara simultan menggunakan MAE dengan waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ekstraksi metode Soxhlet dan hasil rendemen menyerupai hasil ekstraksi fluida superkritis. Pada penggunaannya diperlukan kehati-hatian saat melakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut yang mudah terbakar ataupun ekstrak yang mengandung senyawa termolabil dalam pelarut dengan faktor disipasi tinggi (Salas *et al.*, 2010). Perbedaan antara metode ekstraksi konvensional dan metode ekstraksi modern dapat dilihat pada tabel 2.3

Tabel 2. 2 Perbedaan Metode Ekstraksi Konvensional dan Modern

Parameter	Soxhlet	Ekstraksi Fluida Superkritis	Ekstraksi Gelombang Mikro	Ekstraksi Ultrasonik
Waktu Ekstraksi	3-48 jam	10–60 menit	3–30 menit	10–60 menit
Berat Sampel	1-30 gram	1-5 gram	1-10 gram	1-30 gram
Volume Pelarut	150-500 ml	2-5 mL (padat) 30-60 mL (cair)	10-40 mL	50-200 mL
Kelebihan	Memiliki kapasitas besar	Ekstraksi berjalan cepat, selektivitas tinggi	Ekstraksi cepat, mudah dioperasikan, pelarut tidak terlalu banyak	Mudah dioperasikan

Parameter	Soxhlet	Ekstraksi Fluida Superkritis	Ekstraksi Gelombang Mikro	Ekstraksi Ultrasonik
Kekurangan	Waktu ekstraksi sangat lama, membutuhkan volume pelarut yang besar	Banyak parameter yang digunakan untuk optimasi proses ekstraksi	Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi harus dapat menyerap energi dari microwave, membutuhkan tahap penyaringan	Menggunakan volume pelarut yang besar, membutuhkan tahap penyaringan

Sumber: Otles, 2009

Pada MAE percepatan reaksi kimia melalui pemanasan dengan gelombang mikro merupakan hasil interaksi antara gelombang dan bahan (Perreux dan Loupy, 2001). Gelombang pada frekuensi 2.500 MHz (2,5 GHz) ini diserap oleh air, lemak, dan gula, namun tidak diserap oleh bahan-bahan seperti gelas, keramik, dan sebagian jenis plastik. Bahan logam bahkan memantulkan gelombang ini, sehingga gelombang mikro hanya diserap oleh bahan saja. MAE dapat meningkatkan *yield* ekstraksi dikarenakan sifat penyerapan oleh kapiler dan kapasitas penyerapan air oleh bahan baku semakin tinggi (Quoc, 2014).

Ekstraksi dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain daya *microwave*, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi, jenis pelarut, dan perbandingan padatan dengan pelarut (Kurniasari, 2008). Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam proses ekstraksi didasarkan pada kelarutan senyawa target yang ingin diekstrak, interaksi antara pelarut dan matriks bahan, serta sifat penyerapan energi gelombang mikro pelarut (Mandal *et al*, 2007). Pelarut yang digunakan disarankan memiliki selektifitas yang tinggi terhadap senyawa target dan harus mampu menyerap gelombang mikro, biasanya senyawa polar sangat baik dalam menyerap energi dari gelombang mikro (Santos-Buelga, 2012).

Selain jenis pelarut yang digunakan, volume pelarut yang digunakan juga merupakan salah satu faktor kritis dalam proses ekstraksi. Prinsip utama dalam menentukan volume pelarut adalah volume pelarut harus mencukupi untuk memastikan bahwa bahan telah tercelup seluruhnya ke dalam pelarut selama proses iradiasi berlangsung (Mandal *et al.*, 2007). Namun, menurut Molyneux (2004), dalam ekstraksi gelombang mikro volume pelarut yang lebih banyak

dapat menghasilkan rendemen yang lebih rendah. Hal ini dikarenakan energi gelombang mikro lebih banyak terserap oleh pelarut sebelum sampai ke matrik bahan (Mandal *et al.*, 2007). Selain berakibat pada turunnya rendemen, dari segi ekonomis jumlah pelarut yang berlebih akan berakibat tingginya biaya bahan baku dan pemurnian (Azmi dan Yuniarta, 2015). Sehingga rasio bahan yang akan diekstrak dengan jumlah pelarut yang akan digunakan harus dipilih dengan tepat agar mampu menghasilkan rendemen yang tinggi. Pada penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa jumlah bahan dan volume pelarut yang digunakan dalam ekstraksi metode ini berkisar antara miligram dan mililiter (dalam skala laboratorium) dengan aplikasi rasio minimum 1:10 (mg/ml) hingga 1:20 (mg/ml) (Xiao *et al.*, 2012).

Penentuan daya pada metode *microwave* harus disesuaikan dengan titik didih dari pelarut yang digunakan (Jun *et al.*, 2003). Pemakaian daya yang terlalu besar dapat menyebabkan degradasi pada struktur dan kualitas dari ekstrak yang dihasilkan (Iriany *et al.*, 2017). Daya *microwave* dan suhu ekstraksi saling terkait satu sama lain. Gelombang mikro dari *microwave* yang diserap oleh bahan dapat meningkatkan suhu larutan ekstrak. Semakin besar intensitas gelombang mikro yang diberikan menghasilkan panas yang lebih besar pada bahan yang menyebabkan suhu semakin meningkat. Meningkatnya suhu menyebabkan penurunan viskositas dan tegangan permukaan sedangkan kemampuan pelarut melarutkan bahan menjadi semakin baik. Namun penggunaan daya *microwave* yang terlalu besar menyebabkan suhu larutan menjadi terlalu tinggi mendekati titik didih pelarut sehingga akan ada pelarut yang menguap (Mandal *et al.*, 2007).

Penggunaan suhu tinggi dan daya dijaga tetap tinggi, dinding sel akan cepat pecah, akibatnya selain senyawa target, senyawa yang tidak diinginkan ikut terbawa ke dalam pelarut. Sedangkan, pada daya rendah dinding sel pecah secara bertahap sehingga pelarut dapat selektif terhadap senyawa target. Daya harus dipilih secara tepat untuk menghindari suhu berlebih, yang dapat menyebabkan degradasi senyawa target dan kelebihan tekanan dalam proses ekstraksi (Mandal *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian Bhadoriya *et al.* (2011), penggunaan daya yang optimal untuk ekstraksi dengan metode MAE berkisar antara 80 - 420 Watt. Pada metode MAE penggunaan daya *microwave* dan waktu iradiasi juga merupakan faktor yang saling mempengaruhi dimana kombinasi dari daya rendah atau sedang dengan waktu paparan yang lebih

panjang menjadi pendekatan terbaik dalam proses ekstraksi dengan metode ini. Daya yang tinggi dengan waktu paparan yang panjang akan menaikkan risiko terjadinya degradasi termal senyawa target, sedangkan pada daya yang lebih rendah, perpecahan dinding sel akan terjadi secara berangsur-angsur sehingga pelarut dapat lebih selektif terhadap senyawa target (Mandal *et al.*, 2007).

Waktu ekstraksi akan menghasilkan panas yang terus meningkat seiring dengan bertambahnya lama waktu yang diberikan pada proses ekstraksi, semakin lama waktu ekstraksi yang diberikan maka pemecahan atau pendegradasian dinding-dinding sel akan semakin kuat, akan tetapi bisa terjadi penguapan pelarut akibatnya volumenya berkurang (Kamaluddin dkk., 2014). Umumnya, dengan meningkatnya waktu ekstraksi, jumlah senyawa target dan rendemen meningkat, walaupun terdapat resiko terjadinya degradasi senyawa target itu sendiri. Lama waktu ekstraksi 15-20 menit seringkali dianggap merupakan waktu yang cukup untuk melakukan ekstraksi MAE (Mandal *et al.*, 2007). Akan tetapi, waktu ekstraksi sangat tergantung pada bahan yang diekstrak. Waktu iradiasi dipengaruhi juga oleh nilai dielektri pelarut. Pelarut seperti air, etanol, dan metanol yang dipanaskan dengan waktu paparan yang lama akan memberi resiko pada senyawa yang tidak tahan pada panas (Mandal *et al.*, 2007). Pada ekstraksi MAE, ukuran partikel bahan yang digunakan umumnya dalam kisaran 100 μm hingga 2 mm. bubuk halus atau bahan yang dihaluskan dapat meningkatkan ekstraksi dengan memberikan luas permukaan yang lebih besar, sehingga mempermudah kontak matriks bahan dan pelarut. Selain itu, partikel halus akan memperdalam penetrasi gelombang mikro ke dalam matrik bahan (Mandal *et al.*, 2007).

2.3.2 Pelarut

Pelarut merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas, kemampuan untuk mengekstrak, toksisitas, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Harbone 1984). Jenis dan mutu pelarut yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi, pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkannya, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik, dan mudah terbakar (Ketaren 1986). Proses ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada pelarut polar, seperti etanol, metanol, butanol dan air. Senyawa non

polar juga hanya larut pada pelarut non-polar, seperti eter, kloroform dan n-heksana (Gritter *et al.*, 1991).

Pada penelitian ini, digunakan pelarut air karena didasarkan pada sifatnya yang polar sesuai dengan beberapa jenis antioksidan dalam kluwek yang juga bersifat polar seperti fenol, tanin dan flavonoid. Selain itu, air merupakan pelarut yang aman dan memiliki nilai konstanta dielektrik tinggi yang dapat dilihat pada tabel 2.2. Semakin besar konstanta dielektrik, maka semakin polar pelarut tersebut dan semakin baik dalam mengekstrak bahan yang juga senyawa polar (Renhoran, 2012). Selain itu konstanta dielektrik merupakan ukuran yang menunjukkan kemampuan bahan atau pelarut untuk menyerap gelombang mikro (Erliyanti dan Rosyidah, 2007).

Tabel 2. 3. Beberapa pelarut organik dan sifat fisiknya

Jenis Pelarut	Titik Didih (°C)	Titik Beku (°C)	Konstanta Dielektrik
Heksana	68	-94	1,8
Dietil eter	35	-116	4,3
Kloroform	61	-64	4,8
Etil asetat	77	-84	6,0
Aseton	56	-95	20,7
Etanol	78	-117	24,4
Metanol	65	-98	32,6
Air	100	0	80,2

Sumber : Renhoran (2012)

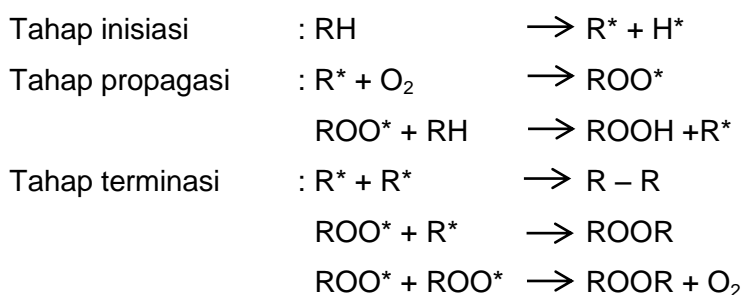
2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu zat yang dapat menetralkan radikal bebas yang terjadi di dalam tubuh sehingga dapat melindungi sistem biologis tubuh dari hal-hal merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi yang menyebabkan oksidasi yang berlebih (Hariyatmi, 2004). Menurut Widjaya (2003), antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang dapat memperlambat oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah sekalipun dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi, menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel normal, protein, dan lemak yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Antioksidan

melengkapi kekurangan elektron pada radikal bebas menjadikan radikal bebas stabil dan menghambat terjadinya reaksi berantai radikal bebas yang dapat menimbulkan oksidasi. Lebih lanjut dijelaskan Widjaya (2003), antioksidan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Berbagai kerusakan seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena oksidasi dapat dihambat oleh antioksidan.

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, radikal bebas sangat reaktif dan tidak stabil, sebagai usaha untuk mencapai kestabilannya radikal bebas akan bereaksi dengan atom atau molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini berlangsung terus menerus dalam tubuh, dan menimbulkan reaksi berantai yang mampu merusak struktur sel, bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Inggrid dan Santoso, 2014). Kereaktifan radikal bebas dipengaruhi adanya elektron tidak berpasangan. Apabila dua radikal bebas bertemu, elektron tidak berpasangan tersebut akan bergabung membentuk ikatan kovalen sehingga akan menyebabkan energinya berkurang. Ketika radikal bebas beraksi dengan senyawa non-radikal, radikal baru akan terbentuk dan reaksi berantai dapat terjadi (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Menurut Widjaya (2003), antioksidan melengkapi kekurangan elektron pada radikal bebas menjadikan radikal bebas stabil dan menghambat terjadinya reaksi berantai radikal bebas yang dapat menimbulkan oksidasi. Reaksi berantai pada radikal bebas (tanpa ada antioksidan) terdiri dari tiga tahap, yaitu (Frindryani, 2016):



Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal bebas (R^*) yang sangat reaktif, karena (RH) melepaskan satu atom hidrogen, hal ini dapat disebabkan

adanya cahaya, oksigen atau panas. Pada tahap propagasi, radikal (R^*) akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (ROO^*). Radikal peroksi selanjutnya akan menyerang RH (misalnya pada asam lemak) menghasilkan hidroperoksida dan radikal baru. Hidrogen peroksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton (Frindryani, 2016). Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan berlanjut sampai tahap terminasi, sehingga antar radikal bebas dapat saling bereaksi membentuk senyawa yang kompleks. Dengan adanya antioksidan, antioksidan memberikan atom hidrogen atau elektron pada radikal bebas (R^* , ROO^*), mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil RH. Sementara turunan radikal antioksidan (A^*) memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal semula R^* (Frindryani, 2016).

Antioksidan dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sekunder atau sintetik (Cahyadi, 2006). Contoh antioksidan sintetik yaitu butil hidroksilanisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propilgallat, dan etoksiquin (Cahyadi, 2006). Menurut Hue *et al.* (2012), terdapat dua tipe antioksidan yang utama yaitu antioksidan primer dan sekunder yang berbeda dalam mekanisme kerjanya. Antioksidan primer mengikat radikal bebas dan memberikan sebuah atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Di sisi lain, antioksidan sekunder bekerja dengan menekan pembentukan radikal bebas yang kemudian mencegah kerusakan oksidatif. Sedangkan menurut Kumalaningsih (2006), fungsi sistem antioksidan tubuh dalam memberikan perlindungan pada jaringan tubuh terhadap efek negatif radikal bebas dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

1. Antioksidan primer, berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru, yaitu SOD (*superoksida dismutase*), *Glutation peroksidase* (GPX) dan katalase
2. Antioksidan sekunder, berfungsi untuk menghambat dan mencegah terjadinya reaksi berantai radikal bebas
3. Antioksidan tersier, berfungsi untuk memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak dikarenakan serangan radikal bebas, yaitu jenis enzim misalnya metionin sulfosida reduktase
4. *Oxygen scavenger* berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, seperti vitamin C

5. *Chelators* atau *sequestrants*, bersifat mengikat logam yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi misalnya asam sitrat dan asam amino

2.4.1 Antioksidan Pada Kluwek

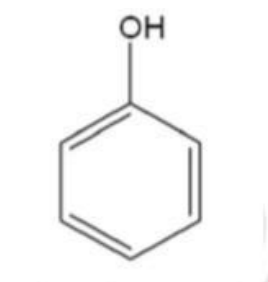
Kluwek (*Pangium edule Reinw*) banyak terdapat di Indonesia dan Malaysia, merupakan bumbu masakan yang mengandung senyawa antioksidan alami (Estiasih dan sofia, 2009). Daging biji kluwek ini mengandung senyawa antioksidan yang berfungsi sebagai antikanker antara lain vitamin C, ion besi, β -karoten, dan senyawa golongan flavonoid (Manuhutu 2011). Lebih lanjut Pokorny (1991) menjelaskan bahwa, sebagian besar biji pangi mengandung sejumlah besar minyak tak jenuh dan antioksidan fenolik yang diperlukan untuk melindungi asam lemak tak jenuh dalam minyak terhadap autoksidasi. Bibit pangi mengandung beberapa metabolit sekunder seperti glikosida sianogen dan berbagai alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, tanin, dan kuinon. Metabolit ini hadir dalam biji pangi segar dan kering (Abdullah, 2012). Hasil penelitian Andarwulan *et al.* (1999), juga menunjukkan bahwa senyawa fenol yang ada dalam biji pangi selama germinasi mempunyai aktivitas antioksidan.

2.4.2 Fenol

Fenol merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat secara langsung kepada sebuah cincin aromatik. Fenol (C_6H_5OH) memiliki banyak kemiripan dengan alkohol dimana struktur alifatiknya terikat pada rantai karbon. Gugus hidroksil fenolik dipengaruhi oleh adanya cincin aromatik yang menyebabkan hidrogen dari hidroksil fenolik bersifat labil dan menyebabkan fenol bersifat sebagai asam lemah (Vermerris dan Ralph, 2006). Menurut Kusumaningtyas *et al.* (2008), golongan fenol memiliki sifat polar yang dapat dilarutkan oleh senyawa yang bersifat polar juga.

Senyawa fenol (asam fenolik, flavonoid, tanin dan lignan) dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan radikal bebas, yaitu dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal bebas (Hernani dan Hayani, 2001). Menurut Karadeniz *et al.* (2005) Senyawa fenolik mempunyai berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, peredam terbentuknya singlet oksigen serta pendonor elektron.

Senyawa fenol merupakan kelompok senyawa kimia yang ditemukan sangat luas pada tanaman. Keberadaan senyawa fenolik dalam tumbuhan dapat berupa fenol sederhana, antroquinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid dan tannin (Hardiansyah, 2009). Sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung fenol dalam jumlah besar. Efek bioaktif yang ditimbulkan ini terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Biasanya, senyawa-senyawa yang memiliki efek bioaktif adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus –OH dan –OR (Okawa *et al.*, 2001). Senyawa golongan fenol ini diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, dimana semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka akan semakin besar pula aktivitas antioksidannya (Shahwar *et al.*, 2010).



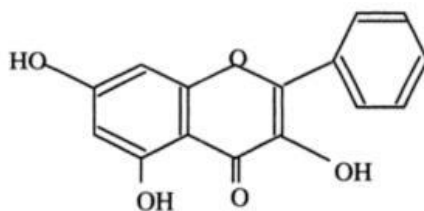
Gambar 2. 3. Struktur Kimia Fenol (Vermerris dan Ralph, 2006)

2.4.3 Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan suatu senyawa metabolit sekunder kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan dalam. Sebagian besar senyawa flavonoida alam ditemukan dalam bentuk glikosida, dimana unit flavonoida terikat pada gula. Glikosida merupakan kombinasi antara suatu gula atau suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida (Lenny, 2006). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya (Maslarova, 2001).

Flavonoid pada tanaman berikatan dengan gula sebagai glikosida dan adapula yang berada dalam aglikon. Aglikon flavonoid bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Flavonoid dapat dikelompokkan menjadi beberapa macam, diantaranya yaitu anthosianin, flavonol, flavon, isoflavon, katekin, hesperidin, naringin, rutin, kuersetin dan tanin (Astawan, 2008). flavonoid merupakan golongan fenol yang merupakan senyawa polar, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, butanol, aseton, dan dimetilsulfoksida (Sjahid, 2008). Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker selain itu flavonoid baik untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Haris, 2011).

Flavonoid dapat berpotensi sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas. Aktivitas sebagai antioksidan yang dimiliki oleh sebagian besar flavonoid karena adanya gugus hidroksil fenolik dalam struktur molekulnya juga melalui daya tangkap terhadap radikal bebas serta aktivitasnya sebagai pengkelat logam. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah dengan mendonorkan ion hidrogen ketika bereaksi dengan senyawa radikal bebas melalui mekanisme transfer elektron sehingga proses oksidasi terhambat (Halliwell and Gutteridge, 1999). Menurut Ratty (1988), aktivitas antioksidan untuk golongan flavonoid memiliki kekuatan yang berbeda. Berikut urutan kekuatan aktivitas antioksidan beberapa flavonoid, mirsetin > kuersetin > morin > diometin > narigenin > apigenin > katekin > 5,7-dihidroksi-3',4',5'-trimetoksi flavon > robinin > kaemferol > flavon. Perbedaan aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh rantai samping dan substituen yang terikat dalam flavonoid tersebut. Flavonoid mempunyai efek klinis yang sangat beragam ketika masuk ke dalam tubuh manusia, hal ini dikarenakan flavonoid mengandung jenis senyawa flavonol dimana didalam flavonol terdapat senyawa kuersetin yang dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidase lemak (Waji, dkk., 2009).



Gambar 2. 4.Struktur Kimia Flavonoid (Silalahi, 2006)

2.4.4 Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol alami yang mengandung gugus hidroksi fenolik dan gugus karboksil dengan bobot molekul yang cukup tinggi (500–3000 Dalton) sehingga dapat membentuk ikatan yang stabil dengan protein dan makromolekul lain dalam kondisi yang sesuai (Hidayat, 2003). Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya (Waghorn & McNabb, 2003).

Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin yang mudah terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin yang mudah terhidrolisis merupakan *polimer gallic* atau *ellagic acid* yang berikatan ester dengan sebuah molekul gula, sedangkan tanin terkondensasi merupakan polimer senyawa flavonoid dengan ikatan karbon-karbon (Westendarp, 2006). Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein hingga pengkelat logam. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002). Menurut Fengel dan Wegener (1995), tanin memiliki sifat polar sehingga akan larut dalam pelarut polar. Menurut Artati dkk. (2007), tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang sifatnya polar, dapat larut dalam gliserol, alkohol dan hidroalkoholik, air dan aseton. Tanin tidak larut dalam kloroform, petroleum eter dan benzene.

Tanin membentuk warna kehitaman dengan beberapa ion logam misalnya ion besi, kalsium, tembaga dan ion magnesium. Senyawa tanin terdiri dari katekin, leukoantosianin dan asam galat, asam kafeat dan khlorogenat serta ester dari asam-asam tersebut yaitu 3- galloilepikatekin, 3 - galloilgallokatekin, fenilkafeat dan sebagainya (Muctadi, 1989). Adanya tanin tersebut dapat menyebabkan warna daging biji pangi menjadi coklat. Reaksi tersebut dikenal

dengan reaksi “*browning enzymatic*”, yang terjadi jika dikatalis oleh enzim polifenolase dengan substrat berupa senyawa fenolik (Winarno, 1991).

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Desmiaty *et al.*, 2008). Tanin dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan fraksi lipid dan keaktifannya dalam penghambatan lipoksigenase (Zeuthen dan Sorensen, 2003). Tanin dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan fraksi lipid dan keaktifannya dalam penghambatan lipoksigenase (Zeuthen dan Sorensen, 2003).

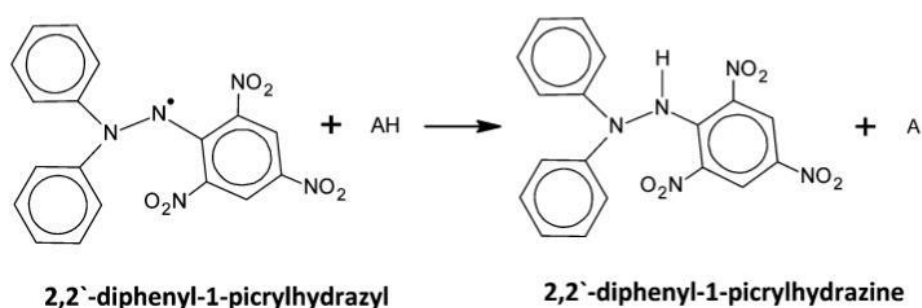
2.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan metode DPPH

Salah satu metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Metode ini telah digunakan untuk menganalisis antioksidan seperti polifenol. DPPH atau 2,2 Difenil-1-picrilhidrazil DPPH adalah suatu senyawa radikal bebas stabil yang dapat menerima sebuah elektron atau hidrogen untuk diubah menjadi molekul diamagnetik. DPPH banyak digunakan pada sistem penelitian aktivitas penangkapan radikal bebas pada senyawa alami tumbuhan (Soares *et al.*, 1997).

DPPH jika bereaksi dengan atom hidrogen yang berasal dari suatu antioksidan akan membentuk DPPH tereduksi. Ada tiga tahap reaksi antara DPPH dengan suatu senyawa yang mengandung antioksidan. Tahap pertama meliputi delokalisasi satu elektron pada gugus yang tersubstitusi dari senyawa tersebut, kemudian senyawa tersebut akan memberikan atom hidrogen untuk mereduksi DPPH. Tahap berikutnya yaitu dimerisasi antara dua radikal fenoksil yang akan mentransfer radikal hidrogen dan akan bereaksi kembali dengan radikal DPPH. Tahap terakhir adalah pembentukan kompleks antara radikal hidroksil dengan radikal DPPH. Pembentukan dimer maupun kompleks yang terjadi antara senyawa antioksidan dengan DPPH tergantung pada kestabilan dan potensi reaksi dari struktur molekulnya. Interaksi yang terjadi antara antioksidan dengan

DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Permatasari, 2011).

Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau atom hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan menurun (Rohman *et al.*, 2010). Metode DPPH merupakan metode yang paling praktis karena waktu inkubasinya sangat singkat yaitu selama 20 menit dan reagen yang digunakan juga sederhana. Sedangkan metode lain yaitu FRAP, hanya dapat mengukur antioksidan yang larut dalam air dan membutuhkan reagen yang sangat banyak (Apak *et al.*, 2007). Aktivitas penangkapan radikal bebas ditunjukkan dengan presentasi berkurangnya warna ungu dari DPPH (Prakash, 2001). Penangkap radikal bebas menyebabkan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sasikumar, 2009). Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian. DPPH adalah dengan IC_{50} (*Inhibition Concentration*).



Gambar 2. 5. Konversi radikal bebas DPPH oleh antioksidan (Krystyna dan Anna, 2013)

2.4.6 Nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*)

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukan aktivitas antioksidan

adalah harga konsentrasi efisien atau efficient concentration (EC_{50}) atau Inhibition Concentration (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan penghambatan sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah (Brand-Williams, 1995). Semakin kecil nilai IC_{50} maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan tersebut (Liem, 2013).

Menurut Molyneaux (2004), klasifikasi antioksidan dibagi menjadi 5, yaitu < 50 ppm (sangat kuat), 50-100 ppm (kuat), 100-150 ppm (sedang), 150- 200 ppm (lemah) dan >200 ppm adalah sangat lemah. Perhitungan nilai IC_{50} dilakukan dengan menghitung nilai inhibisi dari pengujian sampel dengan metode DPPH dengan 5 titik konsentrasi sampel yang berbeda. Nilai inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{inhibisi radikal DPPH} = \frac{(\text{Absorban blanko} - \text{Absorban bahan})}{\text{Absorban blanko}}$$

Nilai IC_{50} didapatkan dari perpotongan garis antara inhibisi radikal bebas dan sumbu konsentrasi yang kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a+bx$, dengan $y = 50$ dan nilai x menunjukkan nilai IC_{50} (Molynex, 2004). Semakin kecil nilai IC_{50} maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan tersebut (Liem, 2013).

III. METODOLOGI PERCOBAAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2018 hingga Juni 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk persiapan sampel adalah timbangan analitik, mortar, palu, blender, sendok dan baskom. Alat yang digunakan untuk ekstraksi sampel adalah *microwave assisted extraction* (Anton Paar), timbangan analitik (Denver Instrumen, Scout Pro, Mettler Toledo), *refrigerator*, botol 50 ml, corong, erlenmeyer 250 mL (Pyrex Iwaki, Herma), pengaduk, kain saring. Sedangkan alat yang digunakan untuk analisis bahan baku dan hasil ekstrak yaitu *microplate reader* (SPECTROstar BMG LABTECH), *spektrofotometer UV-Vis* (Thermo Scientific Genesys 20), oven (Memmert), timbangan analitik (Denver Instrumen, Scout Pro, Mettler Toledo), vortex, *sentrifuse* (Hettich Zentrifigen Eba 20, Hettich Zentrifugen Eba 200), desikator, buret (Scott), kuvet, cawan petri, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, erlenmeyer 250 mL (Pyrex Iwaki, Herma), pipet ukur 1 mL (Pyrex Iwaki, HBG), pipet ukur 10 mL (Pyrex Iwaki), gelas beker 250 mL (Pyrex Iwaki, Herma), labu ukur 10 mL (Pyrex Iwaki), pengaduk, *tube sentrifuse*, gelas ukur 100 mL (Pyrex Iwaki), pipet tetes, kain saring, kertas label, *tissue* dan *aluminium foil*.

3.2.2 Bahan

Kluwek yang digunakan dalam penelitian berasal dari pasar Madyopuro, Kelurahan Madyopuro, Kecamatan Kedungkandang, Kota Malang. Karakteristik biji kluwek yang digunakan adalah biji yang utuh dengan kenampakan luar yang

baik. Daging biji berwarna coklat hingga hitam, utuh (tidak hancur), tidak berkapang (berwarna abu-abu), tidak pahit dan tidak berair.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kluwek , akuades, DPPH 0,2 mM, NaOH 1M, Etanol Pro-Analysis, Asam galat, Quercetin, Asam Tanat, Reagen Folin, AlCl_3 10%, Na_2CO_3 , NaNO_2 5% dan Folin ciucalteu. Semua bahan kimia didapatkan dari laboratorium THP Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Metode Penelitian

Metodologi penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan menggunakan 2 faktor yaitu rasio bahan:pelarut dan waktu ekstraksi. Faktor Rasio bahan:pelarut terdiri 3 variasi yaitu dari 1:5, 1 :10, dan 1:15. Sedangkan untuk lama waktu ekstraksi terdiri dari 10 menit, 15 menit, 20 menit. Sehingga diperoleh 9 kombinasi dengan 3 kali ulangan dan diperoleh 27 satuan percobaan.

Faktor 1 (R) = Rasio bahan:pelarut

R1 = Rasio bahan:pelarut 1:5

R2 = Rasio bahan:pelarut 1:10

R3 = Rasio bahan:pelarut 1:15

Faktor 2 (W) = Waktu Ekstraksi

W1 = Waktu Ekstraksi 10 Menit

W2 = Waktu Ekstraksi 15 Menit

W3 = Waktu Ekstraksi 20 Menit

Tabel 3. 1. Kombinasi Perlakuan Dua Faktor

Perlakuan	W1	W2	W3
R1	R1W1	R1W2	R1W3
R2	R2W1	R2W2	R2W3
R3	R3W1	R3W2	R3W2

Dari kedua faktor tersebut maka diperoleh kombinasi sebagai berikut :

R1W1 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 5 dengan Waktu Ekstraksi 10 Menit

R1W2 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 10 dengan Waktu Ekstraksi 10 Menit

R1W3 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 15 dengan Waktu Ekstraksi 10 Menit

R2W1 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 5 dengan Waktu Ekstraksi 15 Menit

R2W2 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 10 dengan Waktu Ekstraksi 15 Menit

R2W3 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 15 dengan Waktu Ekstraksi 15 Menit

R3W1 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 5 dengan Waktu Ekstraksi 20 Menit

R3W2 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 10 dengan Waktu Ekstraksi 20 Menit

R3W3 = Rasio Bahan:Pelarut 1 : 15 dengan Waktu Ekstraksi 20 Menit

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian terdiri dari dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk menentukan jangkauan rasio bahan:pelarut dan jangkauan waktu ekstraksi yang sesuai untuk digunakan dalam penelitian utama. Pada penelitian pendahuluan digunakan variasi rasio bahan:pelarut 1:5, 1:10 dan 1:20 dan variasi waktu ekstraksi 10 menit, 20 menit dan 30 menit. Pemilihan ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa jumlah bahan dan volume pelarut yang digunakan dalam ekstraksi metode MAE berkisar antara miligram dan mililiter (dalam skala laboratorium) dengan aplikasi rasio minimum 1:10 (mg/ml) hingga 1:20 (mg/ml) (Xiao *et al.*, 2012). Sedangkan Mandal (2007), menyatakan lama waktu ekstraksi 15-20 menit seringkali dianggap merupakan waktu yang cukup untuk melakukan ekstraksi MAE. Hasil penelitian pendahuluan dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3. 2. Data Hasil Penelitian Pendahuluan

Perlakuan	Total Fenol (mg GAE/g)			Total Tanin (mg TAE/g)		
	1:05	1:10	1:20	1:05	1:10	1:20
10 menit	1,63	2,31	0,76	0,91	1,47	0,63
20 menit	2,01	2,82	0,98	1,32	1,95	0,98
30 menit	0,31	0,63	0,12	0,16	0,32	0,07

Berdasarkan hasil uji pada penelitian pendahuluan, maka diketahui bahwa hasil total fenol dan total tanin terbaik berada pada rasio bahan:pelarut 1:10 dengan lama waktu ekstraksi sebesar 20 menit. Sehingga pada penelitian utama, diambil rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi mendekati rasio bahan:pelarut 1:10 dan lama waktu ekstraksi 20 menit. Variasi rasio

bahan:pelarut yang digunakan yaitu 1:5, 1:10 dan 1:15 dan lama waktu ekstraksi sebesar 10, 15 dan 20 menit.

Penelitian utama merupakan tahap ekstraksi menggunakan alat *Modified-MAE* dengan menggunakan range rasio bahan:pelarut dan range lama waktu ekstraksi yang telah didapat dari penelitian pendahuluan. Kemudian melakukan uji aktivitas antioksidan dan parameter lainnya dari ekstrak kasar hasil ekstraksi kluwek.

3.4.1 Persiapan Sampel

1. Pencucian Biji Kluwek

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran seperti debu dan tanah yang melekat pada tempurung biji

2. Pengambilan Daging Biji Kluwek

Pengambilan daging biji kluwek dilakukan dengan membuka tempurung biji dengan menggunakan palu untuk mempermudah membuka tempurung biji kluwek.

3. Sortasi Daging Biji Kluwek

Sortasi daging biji kluwek dilakukan agar didapatkan daging biji kluwek yang layak digunakan sebagai bahan pangan. Daging biji kluwek dipilih berdasarkan karakteristik yang diinginkan yaitu daging utuh tidak hancur, berwarna coklat hingga hitam, tidak pahit, tidak berair dan tidak berkapang (berwarna abu-abu).

4. Penghancuran Daging Biji

Penghancuran daging biji kluwek dilakukan untuk memperbesar luas permukaan bahan. Semakin besar luas permukaan bahan, maka semakin mudah pelarut menarik senyawa bioaktif. Penghancuran biji dilakukan dengan menggunakan mortar alu, kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender.

5. Penimbangan Daging Biji Kluwek

Penimbangan daging biji kluwek yang telah halus, dilakukan dengan menggunakan timbangan analitik sesuai dengan variasi rasio bahan:pelarut. Rasio bahan: pelarut 1:5 menggunakan berat kluwek sebanyak 9 gram. Rasio bahan:pelarut 1:10 menggunakan berat kluwek sebanyak 4,5 gram. Rasio

bahan:pelarut 1;15 menggunakan berat kluwek sebanyak 3 gram. Kluwek halus yang telah ditimbang kemudian dimasukkan kedalam botol kaca.

6. Penambahan Pelarut *Akuades*

Pada semua variasi rasio bahan:pelarut diberi penambahan air sebanyak 45 mL ke dalam botol kaca berisi sampel.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kluwek (Modifikasi dari Sukaryo, 2016)

1. Persiapan Awal Ekstraksi

Sampel kluwek yang telah disiapkan, dimasukkan kedalam masing-masing vessel. Kemudian vessel yang telah berisi sampel diatur posisinya sesuai urutan di dalam *microwave assisted extraction*.

2. Proses Ekstraksi

Setelah semua alat terpasang dengan benar, kemudian diatur kondisi proses pada alat sesuai yang diinginkan seperti suhu, volume pelarut dan waktu ekstraksi yang digunakan.

3. Penimbangan Sampel

Sampel kluwek yang telah diekstrak kemudian ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat awal setelah ekstraksi.

4. Penyaringan Ekstrak

Ekstrak kasar kluwek yang telah ditimbang, kemudian disaring dengan menggunakan kain saring. Padatan hasil penyaringan dihilangkan. Cairan hasil penyaringan dimasukkan ke dalam botol kaca gelap.

5. Penimbangan Ekstrak

Ekstrak hasil penyaringan kemudian ditimbang kembali dengan menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat akhir ekstrak.

3.5 Analisa Senyawa

Analisa senyawa bioaktif dilakukan terhadap ekstrak kluwek fermentasi pekat yang didapatkan dengan metode modified-*Microwave Assisted Extraction* (MAE) meliputi :

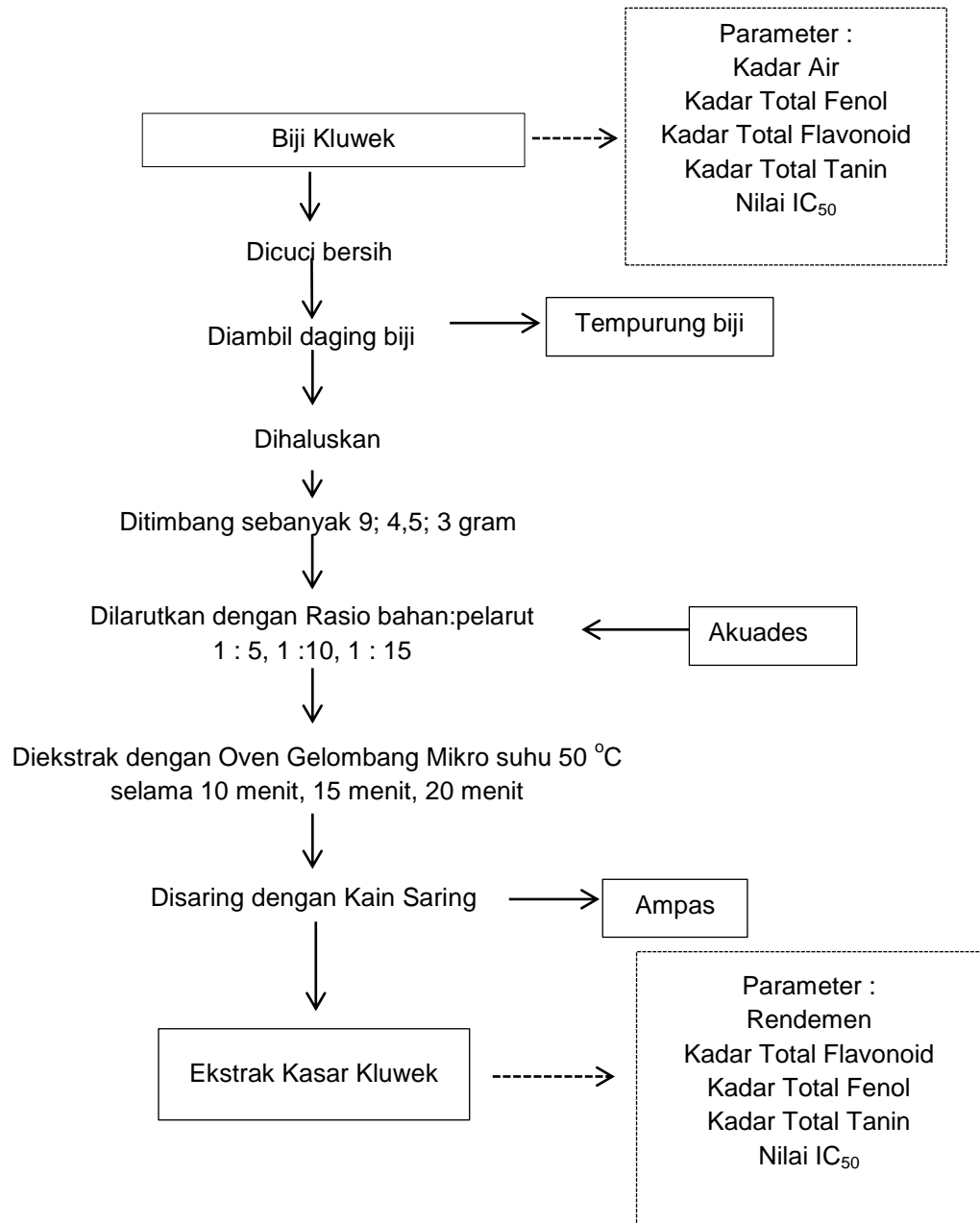
- Analisa Kadar Air Metode Oven Kering (AOAC, 1997)
- Analisa Rendemen Ekstrak (Sudarmadji dkk., 1997)

- Nilai IC_{50} dengan Metode DPPH (Hatano *et al.*, 1989 dalam Prasetya, 2013)
- Uji Total Fenol (Kantangkul *et al.*, 2015)
- Uji Total Flavonoid (Modifikasi Li *et al.*, 2010)
- Uji Total Tanin (Hagerman, 2002)

3.6 Analisa Data

Data dari hasil penelitian dianalisa menggunakan statistik analisa ragam atau Analysis of Variance (ANOVA) dengan menggunakan *Minitab 16*. Apabila dari hasil uji tersebut terdapat adanya pengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) jika terdapat interaksi antar kedua faktor atau dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) jika tidak terdapat interaksi tetapi disalah satu perlakuan atau keduanya ada beda nyata dengan taraf kepercayaan = 95% ($\alpha = 0,05$). Dilakukan penentuan perlakuan terbaik dengan menggunakan metode *Zeleny* dan uji korelasi antara senyawa bioaktif ekstrak kluwek dengan nilai IC_{50} menggunakan metode *Pearson*.

3.7 Diagram Alir



Gambar 3. 1. Diagram Alir Proses Ekstraksi Kluwek (Modifikasi Sukaryo, 2016)

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Bahan Baku

Analisis bahan baku bertujuan untuk mengetahui kondisi awal bahan baku yang akan digunakan dalam proses ekstraksi metode *microwave assisted extraction*. Bahan baku yang digunakan yaitu biji kluwek (*Pangium edule*) yang didapatkan dari pasar Madyopuro, Kelurahan Madyopuro, Kecamatan Kedungkandang, Kota Malang. Semua bahan baku yang dianalisa telah disortir berdasarkan kenampakan daging biji kluwek meliputi keutuhan daging biji, warna daging biji dan ada tidaknya kapang pada daging biji yang ditandai dengan daging biji yang berwarna abu-abu. Semua bahan baku dianalisa dalam keadaan segar tanpa diekstraksi. Analisis awal bahan baku meliputi analisis kadar air, total fenol, total flavonoid, total tanin dan aktivitas antioksidan. Perbandingan hasil analisis bahan baku biji kluwek dengan literatur dapat dilihat pada **Tabel 4.1**

Tabel 4. 1. Perbandingan Hasil Analisis Bahan Baku

Parameter	Biji Kluwek	Literatur	Sumber
Air (%)	54,15 ± 1,33	58,72	Samudry <i>et al</i> (2017)
Total Fenol (mg GAE/g)	1,26 ± 0,12	0,11	Sulistianingsih <i>et al</i> (2014)
Total Flavonoid (mg QAE/g)	0,12 ± 0,01	0,001	Makagansa <i>et al</i> (2015)
Total tanin (mg TAE/g)	1,25 ± 0,03	0,027	Makagansa <i>et al</i> (2015)
Aktivitas Antioksidan (ppm)	60119,60 ± 3200,64	----	-----

Pada **Tabel 4.1** menunjukkan perbedaan antara hasil analisis dan literatur dari bahan baku kluwek. Pada kadar air hasil analisis, didapatkan kadar air bahan sebesar 52,82 %, sedangkan menurut literatur, kadar air kluwek sebesar 58,2%. Kadar air merupakan salah satu sifat fisik dari bahan yang menunjukkan banyaknya air yang terkandung di dalam bahan. Kadar air pada kluwek yang tinggi ini menyebabkan kluwek memiliki sifat yang mudah rusak. Sesuai dengan pernyataan Winarno (2004), Kadar air yang tinggi mengakibatkan mudahnya

bakteri, kapang dan khamir untuk berkembang biak, sehingga akan terjadi perubahan pada bahan pangan.

Perbedaan kadar air bahan baku kluwek dengan literatur diduga karena lama fermentasi biji pangi dan massa simpan dipasar yang berbeda. Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini diambil secara acak pada pedagang sehingga lama fermentasi tidak dapat diketahui dengan pasti. Menurut (Samudry *et al*, 2017), kadar air selama proses fermentasi mengalami perubahan dimana kadar air relatif semakin menurun dengan semakin lamanya waktu fermentasi. Hal ini menunjukkan bahwa selama proses fermentasi biji pangi, terjadi pengeluaran panas dari biji pangi ke lingkungan luar biji. Terjadinya peningkatan suhu dari kontrol sampel diduga karena terjadinya reaksi enzimatik dalam biji pangi selama proses fermentasi, dimana reaksi-reaksi yang dikatalisa oleh enzim mungkin sebagian ada yang menyebabkan terjadinya pelepasan energi atau panas.

Berdasarkan analisa bahan baku kluwek, terdapat perbedaan total fenol pada kluwek hasil analisis yaitu 1,26 mg GAE/g dengan literatur sebesar 0,11 mg GAE/g. Total fenol analisa lebih tinggi dibandingkan dengan literatur. Perbedaan ini disebabkan biji pangi yang digunakan pada literatur hanya direbus dan tidak difermentasi. Menurut Andarwulan *et al*. (1999), total fenolik dalam biji fermentasi meningkat secara substansial selama fermentasi tetapi aktivitas antioksidan dari ekstrak fenolik tidak berubah. Peningkatan total fenolat dikarenakan aktivitas β -glukosidase. Hal ini menyebabkan hasil analisis total fenol bahan baku lebih tinggi, karena biji pangi yang digunakan sudah difermentasi. Selain itu, metode uji yang digunakan juga berbeda, sehingga hasil total fenol yang didapat juga berbeda. Pada literatur digunakan metode ekstraksi maserasi, sedangkan pada penelitian digunakan metode ekstraksi MAE.

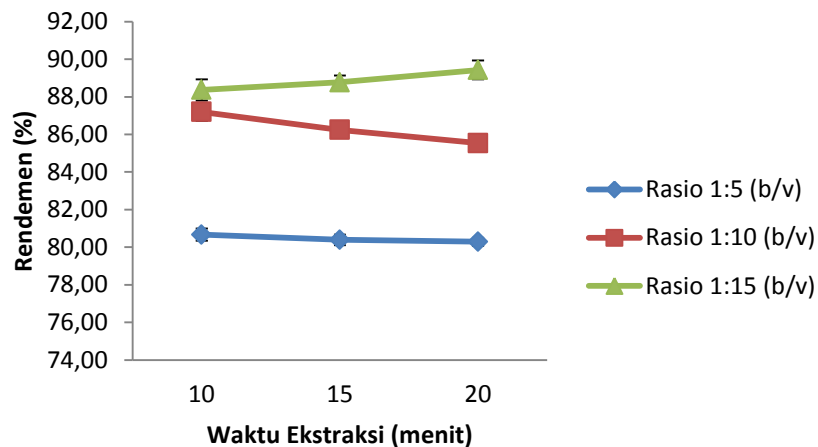
Hasil analisis total flavonoid yang didapat berbeda cukup jauh dengan literatur yang didapat, yaitu pada hasil analisis didapatkan total flavonoid sebesar 0,12 mg QE/g dan pada literatur didapatkan total flavonoid sebesar 0,001 mg QE/g. Perbedaan ini dapat dikarenakan kluwek yang digunakan pada literatur tidak dilakukan proses fermentasi sehingga dapat mempengaruhi total flavonoid yang didapat. Metode uji yang berbeda dan faktor genetik dari biji pangi yang digunakan juga menjadi faktor dari perbedaan hasil flavonoid antara hasil uji dan literatur. Pada literatur digunakan metode ekstraksi maserasi, sedangkan pada penelitian digunakan metode ekstraksi MAE.

Pada hasil analisis, didapatkan total tanin sebesar 1,25 mg TAE/g, sedangkan pada literatur total tanin yang didapat lebih rendah yaitu 0,027 mg TAE/g. Perbedaan ini disebabkan pada literatur, biji pangi yang digunakan tidak difermentasi hanya dilakukan perebusan. Selain itu, tanin yang terukur pada literatur merupakan tanin terkondensasi, sedangkan pada hasil analisis bahan baku merupakan total tanin, sehingga hasil yang didapat pada analisis bahan baku jauh lebih tinggi.

Aktivitas antioksidan dengan metode IC_{50} pada hasil analisis bahan baku didapatkan sebesar $60119,60 \pm 3200,64$ ppm. Nilai IC_{50} ini menunjukkan bahwa pada kluwek, dengan konsentrasi 60119,60 ppm dapat meredam aktivitas radikal DPPH sebanyak 50%. Menurut Molyneaux (2004) menjelaskan bahwa klasifikasi antioksidan dibagi menjadi 5, yaitu < 50 ppm (sangat kuat), 50-100 ppm (kuat), 100-150 ppm (sedang), 150- 200 ppm (lemah) dan >200 ppm adalah sangat lemah. Hal ini menunjukkan bahwa kluwek memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah. Berdasarkan literatur tersebut, maka dapat diketahui bahwa kluwek memiliki aktivitas antioksidan yang rendah. Saat ini belum ditemukan adanya pengukuran aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} .

4.2 Rendemen

Rendemen merupakan *presentase* perbandingan antara berat ekstrak kasar kluwek yang dihasilkan setelah dilakukan proses ekstraksi MAE dengan berat kluwek sebelum diekstrak. Rendemen adalah parameter untuk mengetahui seberapa besar produk yang dihasilkan dari proses produksi. Semakin tinggi hasil rendemen, maka akan semakin efektif suatu proses produksi tersebut. Hasil rerata rendemen ekstrak kluwek akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4. 1. Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Kluwek

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa semakin besar rasio bahan:pelarut, maka semakin besar hasil rendemen ekstrak yang didapatkan. Pada gambar 4.1 juga menunjukkan pada rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi, hasil rendemen yang didapatkan semakin turun. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:15 menunjukkan hal sebaliknya yaitu semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan, maka semakin tinggi hasil rendemen. Nilai rata-rata rendemen ekstrak kluwek akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi didapatkan berkisar antara 80,30 % sampai 89,43%. Nilai rata-rata rendemen tertinggi terdapat pada rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 89,43%. Sedangkan nilai rata-rata rendemen terendah terdapat pada rasio bahan: pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 80,30%.

Hasil analisis ragam (**Lampiran 6**) menunjukkan bahwa perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi memiliki pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap nilai rerata rendemen ekstrak kluwek. Hasil analisis ragam juga menunjukkan adanya interaksi yang nyata dengan selang kepercayaan 5% antara perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi, maka dari itu perlu dilakukan uji lanjut DMRT. Tabel uji lanjut DMRT disajikan pada **tabel 4.2**.

Tabel 4. 2. Rerata Rendemen Ekstrak Kluwek Akibat Perlakuan Rasio bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Lama Ekstraksi (Menit)	Rerata Rendemen (%)	DMRT 5%
1:5	10	80,6667 ± 0.32 a	0,4906
	15	80,3937 ± 0.28 a	0,4768
	20	80,2962 ± 0.21 a	0,4547
1:10	10	87,1982 ± 0.49 d	0,5120
	15	86,2387 ± 0.40 c	0,5070
	20	85,5391 ± 0.24 b	0,5120
1:15	10	88,3662 ± 0.56 e	0,5159
	15	88,7690 ± 0.36 e	0,5190
	20	89,4298 ± 0.51 f	0

Ket: 1) Setiap data merupakan rerata dari tiga ulangan
2) Nilai yang memiliki notasi huruf berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Tabel 4.2 menunjukkan pengaruh perlakuan suhu dan lama waktu ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rerata rendemen ekstrak kluwek. Berdasarkan **tabel 4.2** dapat diketahui pada semua perlakuan rasio bahan:pelarut menunjukkan semakin besar rasio bahan:pelarut, maka nilai rerata rendemen yang diperoleh semakin tinggi. Menurut Supriadi (2002), kelarutan bahan dalam pelarut akan bertambah seiring dengan bertambahnya jumlah pelarut yang kontak dengan bahan ekstraksi. Jumlah molekul pelarut yang meningkat akan meningkatkan kemungkinan tumbukan antara *solute* dengan pelarut, sehingga *solute* dapat berdifusi keluar dari bahan lebih banyak dan dapat meningkatkan rendemen ekstrak.

Hal ini juga dijelaskan oleh Zhang *et al.* (2011), yaitu semakin tinggi rasio bahan:pelarut, maka rendemen semakin meningkat. Rasio bahan:pelarut yang semakin tinggi mengakibatkan tercukupinya komponen senyawa yang terekstrak seiring bertambah banyaknya komponen lain yang tidak diinginkan juga ikut terekstrak, salah satunya yaitu asam-asam organik. Kenaikan rendemen hasil ekstraksi dikarenakan kontak antara matriks bahan dan pelarut akan lebih besar ketika volume pelarut yang lebih besar digunakan, sehingga memudahkan pelarut untuk melakukan penetrasi ke dalam sel matriks bahan dan melarutkan senyawa target. Bukan berarti rendemen yang semakin meningkat juga

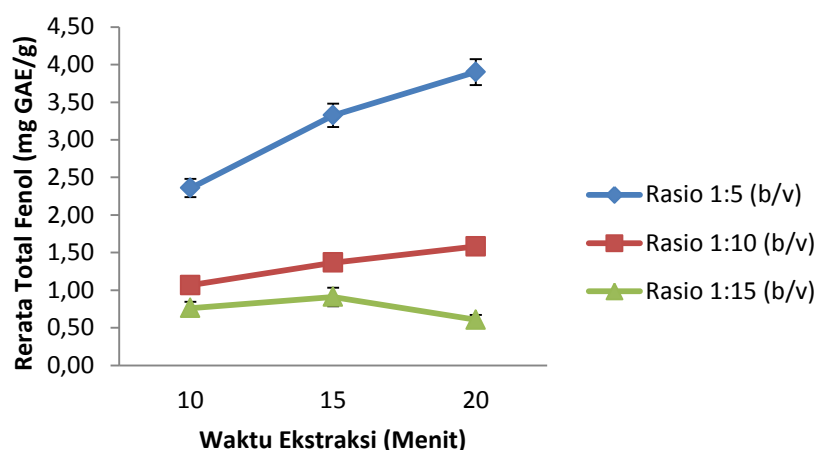
menghasilkan senyawa bioaktif yang meningkat pula, karena ada senyawa pengotor lain yang dapat berkontribusi dalam kandungan rendemen. Menurut Eskilsson dan Bjorklund (2000), volume pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi harus cukup untuk memastikan bahwa seluruh sampel terendam selama proses ekstraksi. Volume pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi dipastikan telah cukup untuk membuat seluruh sampel terendam yang ditandai dengan hasil rendemen yang tinggi pada jumlah sampel yang lebih banyak.

Tabel 4.2 juga menunjukkan pada rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10, semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan pada proses ekstraksi, maka didapatkan nilai rerata rendemen yang semakin rendah. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:15 menunjukkan hal yang sebaliknya, yaitu semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin tinggi rendemen yang dihasilkan. Menurut Widoretno *et. al.* (2016), semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka *yield* yang diperoleh cenderung mengalami kenaikan dan mencapai titik optimum pada waktu tertentu dan kemudian akan mengalami penurunan setelah mencapai waktu optimum. Hal ini dikarenakan kandungan pada bahan memiliki jumlah terbatas dan pelarut yang digunakan mempunyai batas kemampuan untuk melarutkan bahan yang ada, sehingga walaupun waktu ekstraksi diperpanjang, kemampuan solut yang ada pada bahan sudah tidak maksimal. Selain itu, dengan waktu yang terlalu lama dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada senyawa dalam bahan sehingga rendemen yang diperoleh cenderung semakin kecil. Berdasarkan literatur tersebut, maka ekstraksi kluwek dengan rasio bahan: pelarut 1:5 dan 1:10 pada waktu 10 menit merupakan waktu optimum, sehingga pada waktu 15 menit dan 20 menit rendemen ekstrak mengalami penurunan. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit diperkirakan belum mencapai waktu optimum sehingga nilai rerata rendemen masih mengalami kenaikan.

4.3 Total Fenol

Fenol merupakan suatu kelas senyawa kimia yang mempunyai gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung pada gugus senyawa aromatik hidrokarbon. Standar yang digunakan pada analisis kandungan fenolik adalah asam galat, hal ini karena asam galat bersifat lebih stabil. Berdasarkan hasil penentuan

absorbansi larutan standar asam galat (**Lampiran 4**) didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0039 + 0,0571 R^2 = 0,9977$. Kandungan fenol dari standar asam galat ditentukan dengan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Hasil rerata total fenol ekstrak kluwek akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi berkisar antara 0,61 - 3,90 mg GAE/g. Rerata total fenol ekstrak kluwek disajikan dalam **Gambar 4.2**.



Gambar 4. 2. Pengaruh perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap total fenol ekstrak kluwek

Gambar 4.2 menunjukkan nilai rerata total fenol ekstrak kluwek akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi. Nilai fenol tertinggi terdapat pada rasio bahan:pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 3,90 mg GAE/g. Sedangkan nilai rerata total fenol terendah terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 0,61 mg GAE/g. Berdasarkan gambar tersebut diketahui bahwa semakin tinggi rasio bahan:pelarut, maka rerata total fenol semakin turun. Gambar 4.2 dapat diketahui pada rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka rerata total fenol yang didapat semakin besar. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:15 menunjukkan total fenol mengalami kenaikan dari lama waktu ekstraksi 10 menit ke 15 menit, kemudian mengalami penurunan pada menit ke 20.

Hasil analisis ragam (**Lampiran 4**) menunjukkan bahwa perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi memiliki pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap nilai rerata total fenol ekstrak kluwek. Hasil analisis ragam juga menunjukkan adanya interaksi yang nyata dengan selang kepercayaan 5% antara perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi, maka dari itu perlu dilakukan uji lanjut DMRT. Tabel uji lanjut DMRT disajikan pada tabel **4.3**.

Tabel 4. 3. Rerata Total Fenol Ekstrak Kluwek Akibat Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi

Rasio Bahan: Pelarut (b/v)	Lama Ekstraksi (menit)	Rerata Total Fenol (mg GAE/g)	DMRT 5%
1:5	10	2,3585 \pm 0,12 e	0.2222
	15	3,3249 \pm 0,16 f	0.2235
	20	3,9004 \pm 0,17 g	0
1:10	10	1,0660 \pm 0.07 c	0.2184
	15	1,3676 \pm 0,08 d	0.2205
	20	1,5823 \pm 0,06 d	0.2154
1:15	10	0,7629 \pm 0,08 ab	0.2054
	15	0,9117 \pm 0,12 bc	0.2113
	20	0.6065 \pm 0,07 a	0.1958

Ket: 1) Setiap data merupakan rerata dari tiga ulangan
 2) Nilai yang memiliki notasi huruf berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Tabel 4.3 menunjukkan pengaruh perlakuan suhu dan lama waktu ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rerata total fenol ekstrak kluwek. Berdasarkan **tabel 4.3** dapat diketahui pada semua perlakuan rasio bahan:pelarut menunjukkan semakin besar rasio bahan:pelarut, maka nilai rerata total fenol yang diperoleh semakin rendah. Menurut Supriadi (2002), kelarutan bahan dalam pelarut bertambah seiring dengan bertambahnya jumlah pelarut yang kontak dengan bahan. Jumlah molekul pelarut yang meningkat, akan meningkatkan kemungkinan tumbukan antara *solute* dengan pelarut, sehingga *solute* dapat berdifusi keluar dari bahan lebih banyak dan dapat meningkatkan hasil ekstraksi senyawa bioaktif. Namun menurut hasil penelitian Sukaryo (2016) mengenai ekstraksi tanin dalam kluwek dengan metode soklet dengan kajian

variasi berat bahan, menunjukkan semakin besar berat bahan yang digunakan, maka semakin tinggi hasil ekstraksi senyawa bioaktifnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana rasio bahan:pelarut yang semakin kecil, maka semakin besar total fenol yang didapatkan, karena berat sampel yang digunakan lebih besar. Selain itu, pada penelitian ini tidak dilakukan proses pemekatan hasil ekstrak, sehingga menyebabkan ekstrak dengan bahan yang lebih banyak atau rasio bahan:pelarut yang lebih kecil, memiliki konsentrasi analit yang lebih tinggi.

Pada rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka rerata total fenol yang didapat semakin besar. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:15 menunjukkan total fenol mengalami kenaikan dari lama waktu ekstraksi 10 menit ke 15 menit, kemudian mengalami penurunan pada menit ke 20. Rerata total fenol yang semakin tinggi dengan seiring bertambahnya lama waktu ekstraksi yang digunakan ini, dikarenakan meningkatnya waktu ekstraksi dapat memberikan waktu kontak pelarut dengan bahan lebih lama sehingga akan semakin banyak senyawa fenol yang terekstrak.

Menurut Barbero *et al.* (2006), secara umum jumlah analit yang terekstrak akan meningkat dengan memperpanjang waktu ekstraksi walaupun resiko kerusakan analit bisa terjadi. Semakin lama waktu ekstraksi, akan memberikan kesempatan kontak antara bahan dengan pelarut berlangsung lebih lama sehingga memberikan kesempatan lebih besar kepada pelarut untuk menarik senyawa bioaktif (Hariyati, 2006). Hal ini sesuai dengan hasil rerata total fenol yang didapat pada rasio 1:5 dan 1:10.

Kenaikan dan penurunan rerata total fenol yang terjadi pada rasio bahan:pelarut 1:15 diduga karena lama waktu ekstraksi 20 menit larutan sudah mengalami fase jenuh dimana sudah tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi karena waktu sudah mencapai maksimal. Chan *et al.* (2011) menyebutkan bahwa waktu paparan yang berlebih dengan radiasi *microwave* walaupun pada kondisi suhu rendah atau daya yang rendah bisa menurunkan hasil ekstraksi karena hilangnya struktur kimia dari senyawa aktif. Dijelaskan lebih lanjut oleh Oematan (2015), pada awal ekstraksi seluruh senyawa dalam sampel akan terekstrak keluar dan bercampur dengan pelarut, setelah mencapai titik optimal, beberapa senyawa yang terdapat dalam bahan akan mengalami penurunan, akibat pemanasan yang terus-menerus. Menurut penelitian Aulia dan Widjanarko (2018), diketahui pemanasan dengan gelombang mikro akan menyebabkan suhu

ekstraksi terus meningkat seiring dengan bertambahnya waktu ekstraksi yang akan menyebabkan terdegradasinya senyawa fenol.

Berdasarkan literatur tersebut, maka diketahui jika waktu 15 menit merupakan waktu yang optimal untuk ekstraksi pada rasio bahan:pelarut 1:15, sehingga pada waktu ekstraksi 20 menit rerata total fenol sudah mengalami penurunan. Selain itu, rasio bahan:pelarut 1:15 menggunakan jumlah kluwek yang paling sedikit dibandingkan pada variasi lain, sehingga pengambilan komponen terekstrak lebih cepat dibandingkan pada variasi rasio lainnya. Diduga pada lama waktu ekstraksi 15 menit, senyawa yang terekstrak telah mencapai maksimum sehingga pada waktu ekstraksi 20 menit, total fenol yang didapat telah menurun.

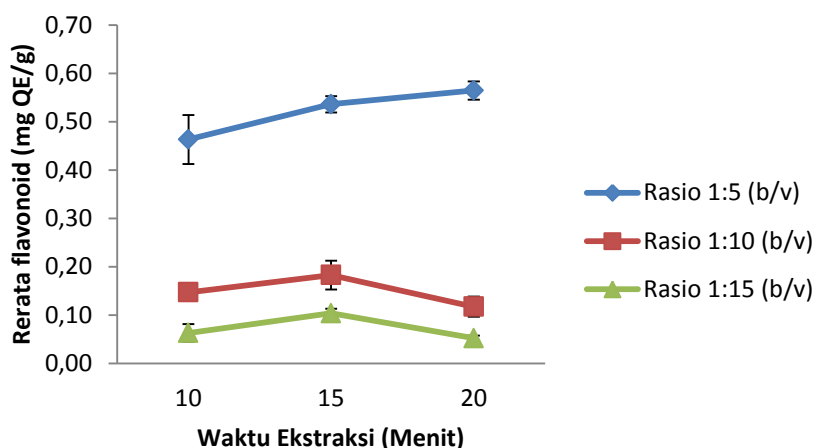
Penurunan fenol juga dapat terjadi karena adanya proses oksidasi senyawa fenol oleh enzim peroksidase selama proses ekstraksi. Takahama (2004) menyebutkan senyawa fenol yang terakumulasi dalam vakuola sel bisa teroksidasi oleh enzim peroksidase dengan terbentuknya peroksida dalam vakuola atau diluar vakuola yang berdifusi ke dalam organel. Penghancuran struktur sel oleh gelombang mikro selama proses ekstraksi bisa mengakibatkan terjadinya proses oksidasi fenol tersebut. Semakin lama waktu ekstraksi maka kemungkinan proses oksidasi juga terjadi dalam waktu yang lama sehingga akan terjadi penurunan nilai kadar total fenol dari ekstrak tersebut. Selain karena proses oksidasi oleh enzim peroksidase, degradasi senyawa fenol juga bisa berkaitan dengan struktur kimianya. Semakin banyak gugus hidroksi yang ada pada cincin aromatik akan semakin mudah senyawa fenol tersebut terdegradasi selama proses ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro karena semakin banyak gelombang mikro yang terserap oleh senyawa fenol tersebut (Wang *et al.* 2008). Dengan demikian semakin lama paparan gelombang mikro dalam proses ekstraksi, diduga bisa menurunkan kadar total fenol karena adanya senyawa yang terdegradasi.

Waktu Ekstraksi dan Rasio bahan:pelarut dapat saling berkaitan. Semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan, maka suhu yang diperoleh semakin meningkat. Efek suhu pada sampel akan dipengaruhi oleh massa larutan yang diekstrak. Semakin banyak massa larutan, maka kenaikan suhunya semakin kecil dengan energi panas yang sama. Adanya kenaikan suhu yang lebih kecil, maka kemungkinan terjadinya penguapan pelarut semakin kecil pula (Farida dkk, 2015), dengan kata lain semakin besar massa larutan, maka waktu ekstraksi

yang dibutuhkan semakin lama. Berdasarkan hal tersebut, waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut dapat saling berinteraksi.

4.4 Total Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa fenolik yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Standar yang digunakan pada analisis kandungan flavonoid adalah kuersetin. Berdasarkan hasil penentuan absorbansi larutan standar kuersetin (**Lampiran 5**) didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0018x + 0,0173$, $R^2 = 0,9824$. Hasil rerata total flavonoid ekstrak kluwek akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi berkisar antara 0,05 – 0,56 mg QE/g. Rerata total flavonoid ekstrak kluwek disajikan dalam **Gambar 4.3**.



Gambar 4. 3. Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rerata Total Flavonoid Ekstrak Kluwek

Gambar 4.3 menunjukkan nilai rerata total flavonoid ekstrak kluwek akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi. Berdasarkan gambar tersebut diketahui semakin besar rasio bahan:pelarut, maka semakin rendah rerata total flavonoid. Selain itu **Gambar 4.3** juga menunjukkan pada rasio bahan:pelarut 1:5, rerata total flavonoid mengalami kenaikan seiring dengan meningkatnya lama waktu ekstraksi yang digunakan. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:10 dan 1:15, rerata total flavonoid mengalami kenaikan pada

menit ke 15 yang kemudian mengalami penurunan pada menit ke 20. Nilai total flavonoid tertinggi terdapat pada rasio bahan:pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 0,56 mg QE/g. Sedangkan nilai rerata total flavonoid terendah terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 0,05 mg QE/g.

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa perlakuan rasio bahan:pelarut memiliki pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap nilai rerata total flavonoid ekstrak kluwek, sedangkan perlakuan lama waktu ekstraksi tidak memiliki pengaruh yang nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap nilai rerata total flavonoid ekstrak kluwek. Hasil analisis ragam juga tidak menunjukkan adanya interaksi yang nyata dengan selang kepercayaan 5% antara perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi, maka dari itu perlu dilakukan uji lanjut BNT untuk perlakuan rasio bahan:pelarut. Tabel uji lanjut BNT disajikan pada tabel 4.4.

Tabel 4. 4. Rerata Total Flavonoid Akibat Perlakuan Rasio Bahan: Pelarut

Rasio	Rerata Total Flavonoid (mg QE/g)	Notasi	BNT 5%
R1	0,47 \pm 0,052 a	A	0,090
R2	0,15 \pm 0,033 b	B	
R3	0,07 \pm 0,027 b	B	

Ket: 1) Setiap data merupakan rerata dari tiga ulangan
2) Nilai yang memiliki notasi huruf berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan rasio bahan:pelarut terhadap total flavonoid tertinggi terdapat pada variasi rasio bahan:pelarut 1:5 yaitu sebesar 0,47 mg QE/g. hasil tersebut berbeda nyata dengan variasi rasio bahan:pelarut 1:10 dan 1:15 yang berturut - turut sebesar 0,15 mg QE/g dan 0,07 mg QE/g. Hasil analisa menunjukkan bahwa perlakuan variasi rasio bahan:pelarut yang meningkat, menyebabkan terjadinya penurunan rerata total flavonoid.

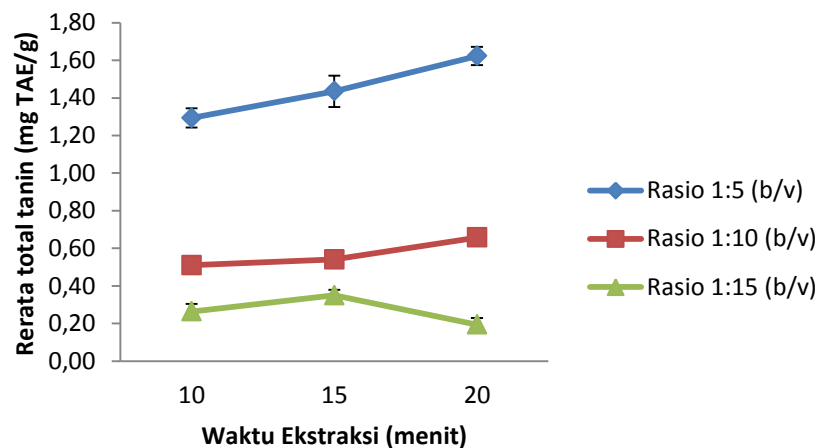
Banyaknya pelarut mempengaruhi luas kontak padatan dengan pelarut, semakin banyak pelarut maka luas kontak akan semakin besar, sehingga distribusi pelarut ke padatan akan semakin besar. Meratanya distribusi pelarut ke padatan akan memperbesar rendemen yang dihasilkan (Jayanudin dkk, 2014). Namun menurut hasil penelitian Sukaryo (2016) mengenai ekstraksi tanin dalam

kluwek dengan metode soklet dengan kajian variasi berat bahan, menunjukkan semakin besar berat bahan yang digunakan, maka semakin tinggi hasil ekstraksi senyawa bioaktifnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana rasio bahan:pelarut yang semakin kecil, maka semakin besar total flavonoid yang didapatkan, karena berat sampel yang digunakan lebih besar. Selain itu, pada penelitian ini tidak dilakukan proses pemekatan hasil ekstrak, sehingga menyebabkan ekstrak yang menggunakan berat bahan yang lebih banyak atau rasio bahan:pelarut yang lebih kecil, memiliki konsentrasi yang lebih tinggi.

Sementara itu, untuk pengujian BNT dengan selang kepercayaan 5% pada perlakuan lama waktu ekstraksi menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata terhadap total flavonoid ekstrak kluwek pada semua variasi waktu ekstraksi 10, 15 dan 20 menit. Hal ini diduga karena selisih waktu yang digunakan terlalu sedikit sehingga mengakibatkan hasil total flavonoid tidak jauh berbeda meskipun terjadi peningkatan total flavonoid seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi pada rasio bahan:pelarut 1:5. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:10 dan 1:15 terjadi peningkatan total flavonoid pada menit ke 15 yang kemudian mengalami penurunan pada menit ke 20. Menurut Hariyati (2006) semakin lama waktu ekstraksi, akan memberikan kesempatan kontak antara bahan dengan pelarut berlangsung lebih lama sehingga memberikan kesempatan lebih besar kepada pelarut untuk menarik senyawa bioaktif. Dijelaskan lebih lanjut oleh Yulianti *et, al.* (2014), Kelarutan komponen dalam bahan berjalan dengan perlahan sebanding dengan kenaikan waktu, akan tetapi, setelah mencapai waktu optimal jumlah komponen yang terambil dari bahan akan mengalami penurunan. Hal ini disebabkan komponen-komponen yang terdapat dalam bahan jumlahnya terbatas dan pelarut yang digunakan mempunyai batas kemampuan untuk melarutkan bahan yang ada, sehingga walaupun waktu ekstraksi diperpanjang, *solute* yang ada di dalam bahan sudah tidak ada. Berdasarkan literatur tersebut, diduga pada rasio bahan:pelarut 1:10 dan 1:15 pada waktu 15 menit proses ekstraksi flavonoid sudah mencapai waktu optimal, sehingga pada waktu ekstraksi 20 menit nilai total flavonoid telah mengalami penurunan.

4.5 Total Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil. Senyawa tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Berdasarkan hasil penentuan absorbansi larutan standar asam tanat (**Lampiran 6**) didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0145x + 0,0573$ $R^2 = 0,9969$. Hasil rerata total tanin ekstrak kluwek akibat perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama ekstraksi berkisar antara 0,19 - 1,62 mg TAE/g. Rerata total flavonoid ekstrak kluwek disajikan dalam **Gambar 4.4**



Gambar 4. 4. Pengaruh Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Rerata Total Tanin Ekstrak Kluwek

Gambar 4.4 menunjukkan nilai rerata total tanin ekstrak kluwek akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi. Pada gambar tersebut, secara umum menunjukkan semakin besar rasio bahan:pelarut, maka semakin rendah rerata total tanin. Selain itu, pada **gambar 4.4** juga dapat dilihat rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan, maka semakin tinggi rerata total tanin yang didapatkan. Sedangkan pada rasio bahan:pelarut 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin rendah nilai rerata total tanin. Nilai rerata total tanin tertinggi terdapat pada rasio bahan:pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 15 menit sebesar 1,62

mg TAE/g. Sedangkan nilai rerata total tanin terendah terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 0,19 mg TAE/g.

Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa pada perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terjadi interaksi yang nyata pada selang kepercayaan 5%, maka dari itu perlu dilakukan uji lanjut DMRT. Tabel uji lanjut DMRT disajikan pada tabel 4.5.

Tabel 4. 5. Rerata Total Tanin Akibat Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Lama Ekstraksi (Menit)	Rerata Total Tanin (mg TAE/g)	DMRT 5%
1:5	10	1,29 ± 0,05 e	0.0870
	15	1,44 ± 0,08 f	0.0875
	20	1,62 ± 0,05 g	0
1:10	10	0,51 ± 0,04 c	0.0843
	15	0,54 ± 0,04 c	0.0854
	20	0,66 ± 0,04 d	0.0863
1:15	10	0,26 ± 0,04 a	0.0804
	15	0,35 ± 0,03 b	0.0827
	20	0,19 ± 0,03 a	0.0766

Ket: 1) Setiap data merupakan rerata dari tiga ulangan
2) Nilai yang memiliki notasi huruf berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Tabel 4.5 menunjukkan pengaruh perlakuan suhu dan lama waktu ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rerata total tanin ekstrak kluwek. Hasil penelitian total tanin pada kluwek menunjukkan semakin tinggi rasio bahan:pelarut, maka semakin rendah total tanin yang didapat. Menurut Supriadi (2002), kelarutan bahan dalam pelarut bertambah seiring dengan bertambahnya jumlah pelarut yang kontak dengan bahan. Jumlah molekul pelarut yang meningkat, akan meningkatkan kemungkinan tumbukan antara *solute* dengan pelarut, sehingga *solute* dapat berdifusi keluar dari bahan lebih banyak dan dapat meningkatkan hasil ekstraksi senyawa bioaktif. Namun menurut hasil penelitian Sukaryo (2016) mengenai ekstraksi tanin dalam kluwek dengan metode soklet dengan kajian variasi berat bahan, menunjukkan semakin besar berat bahan yang digunakan, maka semakin tinggi hasil ekstraksi senyawa bioaktifnya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, dimana rasio bahan:pelarut yang semakin kecil

menunjukkan semakin besar total tanin yang didapatkan, karena berat sampel yang digunakan lebih besar. Selain itu, pada penelitian ini tidak dilakukan proses pemekatan hasil ekstrak, sehingga menyebabkan ekstrak dengan berat bahan lebih besar atau rasio bahan:pelarut yang lebih kecil, memiliki konsentrasi analit yang lebih tinggi.

Pada variasi lama waktu ekstraksi, rerata total tanin pada rasio 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin tinggi rerata total tanin yang didapat. Namun pada variasi rasio bahan:pelarut 1:15, menunjukkan rerata total tanin mengalami kenaikan pada waktu 15 menit yang kemudian mengalami penurunan pada waktu 20 menit. Menurut Hariyati (2006) semakin lama waktu ekstraksi, akan memberikan kesempatan kontak antara bahan dengan pelarut berlangsung lebih lama sehingga memberikan kesempatan lebih besar kepada pelarut untuk menarik senyawa bioaktif. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada variasi rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 yang menandakan bahwa waktu 20 menit dapat menarik senyawa bioaktif lebih banyak dikarenakan waktu kontak bahan dan pelarut yang lebih lama. Selain itu, jumlah kluwek yang digunakan pada rasio 1:5 dan 1:10 lebih tinggi dibandingkan rasio bahan:pelarut 1:15, sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama agar seluruh senyawa dapat terekstrak. Penurunan total tanin yang terjadi pada perbandingan rasio bahan:pelarut 1:15 ini, sesuai dengan pernyataan Shinta (2008), yaitu waktu ekstraksi pada setiap bahan memiliki batas optimum, dimana penambahan waktu melampaui batas optimumnya menjadi tidak berpengaruh, hal ini karena dimungkinkan senyawa yang sudah berpindah ke pelarut akan mengalami dekomposisi karena pemanasan yang terus-menerus.

Waktu ekstraksi yang semakin lama akan menghasilkan tanin yang terekstrak lebih banyak sampai titik optimumnya. Disamping itu, penurunan tanin diduga disebabkan akibat proses hidrolisis selama proses ekstraksi dan pemanasan yang berlangsung terus-menerus. Tanin dapat terhidrolisis menjadi glukosa dan asam tanat (Sukardi *et al*, 2007). Pada penelitian Eka dan Florentina (2017), juga diketahui bahwa meningkatkan waktu ekstraksi akan menghasilkan jumlah tanin yang tinggi. Akan tetapi jika terlalu lama juga dapat menyebabkan senyawa tanin terdegradasi. Pada rasio bahan:pelarut 1:15, digunakan jumlah kluwek yang paling sedikit, sehingga membutuhkan waktu yang lebih singkat dibandingkan pada variasi rasio lain sehingga waktu yang digunakan untuk menarik senyawa terekstrak secara maksimal lebih singkat. Berdasarkan literatur

tersebut, maka diduga pada sampel rasio bahan:pelarut 1:15 pada lama waktu ekstraksi 15 menit sudah mencapai titik optimal, sehingga pada waktu ekstraksi 15 menit dan 20 menit rerata total tanin mengalami penurunan.

Waktu Ekstraksi dan rasio bahan:pelarut dapat saling berkaitan. Semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan, maka suhu yang diperoleh semakin meningkat. Efek suhu pada sampel akan dipengaruhi oleh massa larutan yang diekstrak. Semakin banyak massa larutan, maka kenaikan suhunya semakin kecil dengan energi panas yang sama. Adanya kenaikan suhu yang lebih kecil, maka kemungkinan terjadinya penguapan pelarut semakin kecil pula (Farida dkk, 2015). dengan kata lain, semakin besar massa larutan, maka waktu ekstraksi yang dibutuhkan semakin lama. Berdasarkan hal tersebut, waktu ekstraksi dan rasio bahan:pelarut dapat saling berinteraksi.

4.6 Nilai IC₅₀

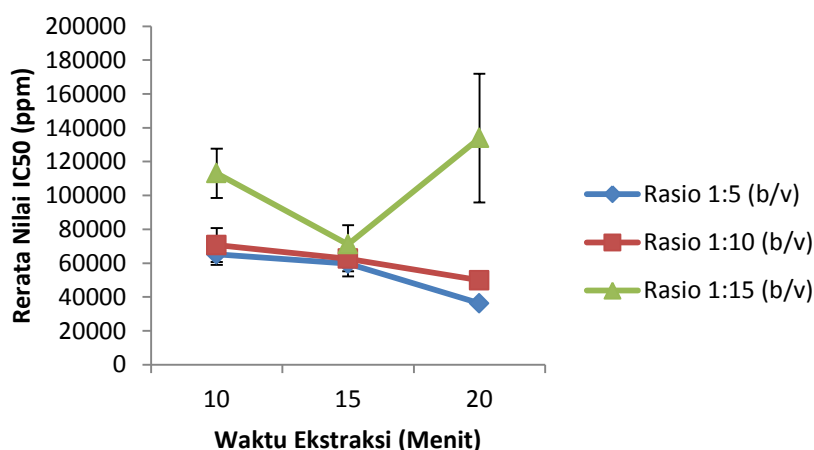
Antioksidan merupakan suatu senyawa yang akan menghambat atau menunda proses oksidasi substrat pada konsentrasi yang rendah. Karakter utama senyawa antioksidan adalah pada kemampuannya yang dapat menangkap radikal bebas. Bertambahnya suatu radikal bebas dari luar yang masuk ke dalam tubuh akan mempersulit tubuh untuk mengatasi serangan radikal bebas. Oleh karena itu, antioksidan berfungsi untuk membantu ketidakmampuan sistem antioksidan tubuh (Prakash, 2001).

Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan metode DPPH (2,2 Difenil-1-picrilhidrazil). DPPH merupakan senyawa radikal bebas stabil yang dapat menerima sebuah elektron atau hidrogen untuk diubah menjadi molekul diamagnetik. DPPH banyak digunakan pada sistem penelitian aktivitas penangkapan radikal bebas pada senyawa alami tumbuhan (Soares *et al.*, 1997). Pada penelitian ini, digunakan DPPH berkonsentrasi 0,2 mM. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan IC₅₀ (*Inhibition Concetration*). IC₅₀ merupakan konsentrasi sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%.

Pengujian kuantitatif metode DPPH dilakukan dengan cara menghitung nilai persen inhibisi dan dilanjutkan dengan perhitungan nilai IC₅₀. Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen inhibisi (%). Persen inhibisi adalah nilai penghambatan radikal bebas, sedangkan nilai IC₅₀ atau *Inhibition Concentration*

50% menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari perpotongan garis antara daya hambat dan sumbu konsentrasi yang kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a+bx$, dengan $y = 50$ dan nilai x menunjukkan nilai IC_{50} (Molynex, 2004). Semakin kecil nilai IC_{50} maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan tersebut (Liem, 2013).

Senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan pada kluwek berupa senyawa fenol, flavonoid dan tanin. Perhitungan nilai IC_{50} pada ekstrak kluwek segar dilakukan dengan cara mengencerkan ekstrak kluwek secara bertingkat, dimana pada ekstrak kluwek rasio bahan:pelarut 1:5 diencerkan menjadi 5.000 ppm, 10.000 ppm, 15.000 ppm, 20.000 ppm, dan 25.000 ppm. Pada ekstrak kluwek rasio bahan:pelarut 1:10 diencerkan menjadi 8.000 ppm, 16.000 ppm, 24.000 ppm, 32.000 ppm dan 40.000 ppm. Sedangkan pada ekstrak kluwek rasio bahan:pelarut 1:15 diencerkan menjadi 10.000 ppm, 20.000 ppm, 30.000 ppm, 40.000 ppm dan 50.000 ppm. Grafik rerata nilai IC_{50} ekstrak kluwek akibat perbedaan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi dapat dilihat pada **gambar 4.5**.



Gambar 4. 5. Pengaruh perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap rerata nilai IC_{50} ekstrak kluwek

Gambar 4.5 menunjukkan nilai rerata IC_{50} kluwek akibat pengaruh rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi. Rerata nilai aktivitas antioksidan ekstrak kasar kluwek berkisar antara 36.228 – 133.952%. Nilai IC_{50} tertinggi terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:15 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit sebesar 133.951 ppm yang menandakan memiliki aktivitas antioksidan terendah, sedangkan nilai IC_{50} terendah terdapat pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:5 dengan lama waktu ekstraksi 20 menit yang menandakan memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

Hasil penelitian mengenai nilai IC_{50} pada kluwek menunjukkan pada semua variasi rasio bahan:pelarut mengalami kenaikan nilai IC_{50} pada semua waktu ekstraksi. Sedangkan pada variasi waktu cenderung mengalami penurunan nilai IC_{50} , kecuali pada variasi rasio bahan:pelarut 1:5 yang mengalami kenaikan pada waktu ekstraksi 15 menit lalu mengalami penurunan pada waktu ekstraksi 20 menit. Pada rasio bahan:pelarut 1:5 dengan waktu ekstraksi 10 menit nilai IC_{50} sebesar 65.178 ppm, kemudian mengalami penurunan pada waktu ekstraksi 15 menit menjadi 59.704 ppm dan mengalami penurunan kembali pada menit ke 20 menjadi 36.228 ppm. Pada rasio bahan:pelarut 1:10 dengan waktu ekstraksi 10 menit memiliki nilai IC_{50} sebesar 70.66 ppm, kemudian mengalami penurunan pada waktu ekstraksi 15 menit menjadi 62.658 ppm dan terus turun menjadi 49.869 ppm pada waktu ekstraksi 20 menit. Terakhir pada variasi rasio bahan:pelarut 1:15 diketahui nilai IC_{50} yang didapat sebesar 113.114 ppm, kemudian meningkat menjadi 133.951 ppm pada menit ke 15 dan selanjutnya mengalami penurunan pada waktu ekstraksi 20 menit menjadi 71.119 ppm.

Hasil analisis ragam (**Lampiran 6**) menunjukkan bahwa perlakuan rasio bahan:pelarut memiliki pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap rerata nilai IC_{50} ekstrak kluwek, sedangkan perlakuan lama waktu ekstraksi tidak memiliki pengaruh yang nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap nilai rerata IC_{50} ekstrak kluwek. Hasil analisis ragam juga menunjukkan adanya interaksi yang nyata dengan selang kepercayaan 5% antara perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi, maka dari itu perlu dilakukan uji lanjut DMRT. Tabel uji lanjut DMRT disajikan pada **tabel 4.6**.

Tabel 4. 6. Rerata Nilai IC₅₀ Akibat Perlakuan Rasio Bahan:Pelarut dan Lama Waktu Ekstraksi

Rasio Bahan:Pelarut	Lama Ekstraksi (Menit)	Nilai IC ₅₀ (ppm)	DMRT 5%
1:5	10	65178,08 ± 6232.60 b	30128.8712
	15	59704,56 ± 7490,15 ab	29155.5185
	20	36228,99 ± 813,11 a	27019.5500
1:10	10	70663,47 ± 10041.69 b	30128.8712
	15	62658,15 ± 7533,90 ab	29714.2950
	20	49869,26 ± 1887,43 ab	28335.3787
1:15	10	113114,92 ± 14525,10 c	30840.8606
	15	71119,37 ± 11252,43 b	28335.3787
	20	133951 ± 37990,12 c	0

Ket: 1) Setiap data merupakan rerata dari tiga ulangan
 2) Nilai yang memiliki notasi huruf berbeda menyatakan berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$

Berdasarkan hasil pengukuran nilai IC₅₀ tersebut, maka diketahui pada semua variasi rasio bahan:pelarut menunjukkan semakin tinggi rasio bahan:pelarut, maka semakin tinggi pula nilai IC₅₀ yang berarti aktivitas antioksidan pada ekstrak kluwek semakin rendah. Menurut Supriadi (2002), kelarutan bahan dalam pelarut bertambah seiring dengan bertambahnya jumlah pelarut yang kontak dengan bahan. Jumlah molekul pelarut yang meningkat, akan meningkatkan kemungkinan tumbukan antara solute dengan pelarut, sehingga solute dapat berdifusi keluar dari bahan lebih banyak dan dapat meningkatkan hasil ekstraksi senyawa bioaktif. Semakin banyak senyawa bioaktif yang dapat terekstrak, maka dapat menyebabkan semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya.

Namun menurut hasil penelitian Sukaryo (2016) mengenai ekstraksi tanin dalam kluwek dengan metode sokhlet menunjukkan semakin besar berat bahan yang digunakan, maka semakin tinggi hasil ekstraksi senyawa bioaktif. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana rasio bahan:pelarut yang semakin kecil, maka semakin besar senyawa bioaktif yang didapatkan, karena berat sampel yang digunakan lebih besar. Selain itu, pada penelitian ini tidak dilakukan proses pemekatan hasil ekstrak, sehingga ekstrak yang menggunakan berat bahan yang lebih besar atau rasio bahan:pelarut yang lebih kecil, memiliki konsentrasi yang

lebih tinggi sehingga senyawa bioaktif yang didapatkan juga lebih besar dan nilai IC_{50} yang didapatkan lebih rendah.

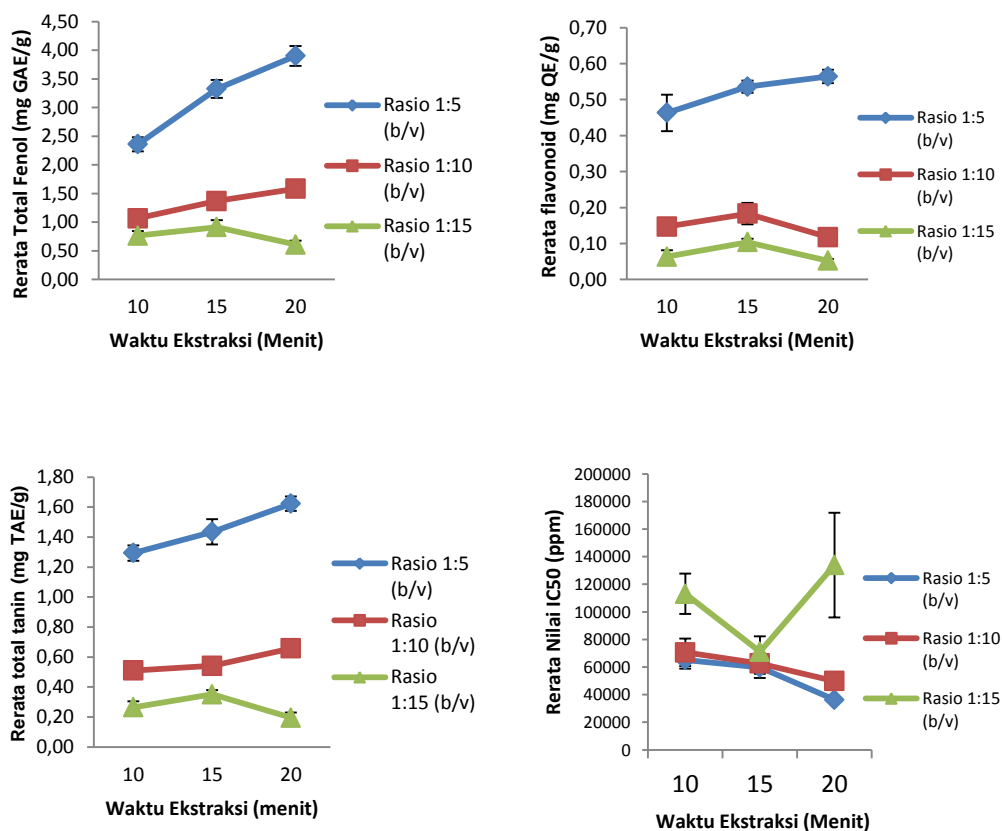
Pada variasi lama waktu ekstraksi, hasil pengukuran nilai IC_{50} pada rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 menunjukkan semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin rendah nilai IC_{50} yang berarti semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Sedangkan pada variasi rasio bahan:pelarut 1:15, menunjukkan hal yang berbeda yaitu nilai IC_{50} pada lama waktu ekstraksi 15 menit mengalami penurunan, kemudian mengalami kenaikan kembali pada menit ke 20. Hal ini berarti pada rasio bahan:pelarut 1:15, aktivitas antioksidan ekstrak kluwek pada menit ke 15 mengalami kenaikan yang kemudian pada menit ke 20 mengalami penurunan.

Menurut Hariyati (2006) semakin lama waktu ekstraksi, akan memberikan kesempatan kontak antara bahan dengan pelarut berlangsung lebih lama sehingga memberikan kesempatan lebih besar kepada pelarut untuk menarik senyawa bioaktif. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada variasi rasio bahan:pelarut 1:5 dan 1:10 yang menandakan bahwa waktu 20 menit dapat menarik senyawa bioaktif lebih banyak dikarenakan waktu kontak bahan dan pelarut yang lebih lama. Sedangkan penurunan dan kenaikan aktivitas antioksidan pada perbandingan rasio bahan:pelarut 1:15 ini, sesuai dengan pernyataan Oematan (2015) yang menyatakan pada awal ekstraksi seluruh senyawa dalam sampel akan terekstrak keluar dan bercampur dengan pelarut dan setelah mencapai titik optimal, beberapa senyawa yang terdapat dalam bahan akan mengalami penurunan. Berdasarkan literatur tersebut, maka diduga pada sampel rasio bahan:pelarut 1:15 pada lama waktu ekstraksi 15 menit sudah mencapai titik optimal, sehingga pada waktu ekstraksi 20 menit aktivitas antioksidan mengalami penurunan. Menurut Molyneaux (2004) menjelaskan bahwa klasifikasi antioksidan dibagi menjadi 5, yaitu < 50 ppm (sangat kuat), 50-100 ppm (kuat), 100-150 ppm (sedang), 150- 200 ppm (lemah) dan >200 ppm adalah sangat lemah. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kluwek merupakan antioksidan yang sangat lemah.

4.7 Korelasi Antara Senyawa Bioaktif dan Nilai IC_{50}

Aktivitas antioksidan pada ekstrak kluwek dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya komponen senyawa bioaktif seperti total fenol, total flavonoid dan

total tanin. Berdasarkan hasil analisa yang sudah didapatkan, dilakukan uji korelasi pearson menggunakan SPSS untuk melihat bagaimana pengaruh senyawa bioaktif seperti total fenol, total flavonoid dan total tanin terhadap nilai IC_{50} ekstrak kluwek. Korelasi *Pearson Product Moment*, yaitu salah satu teknik yang dikembangkan oleh Karl Pearson untuk menghitung koefisien korelasi. Kegunaan uji Pearson Product Moment atau analisis korelasi adalah untuk mencari hubungan variable bebas (X) dengan variabel terikat (Y) dan data berbentuk interval dan ratio (Alimuddin, 2011). Grafik hasil uji tiap parameter yaitu total fenol, total flavonoid, total tannin dan nilai IC_{50} dapat dilihat pada **gambar 4.6** dan hasil uji korelasi *pearson* dapat dilihat pada **tabel 4.7**.



Gambar 4. 6. Grafik Total Fenol, Total Flavonoid, Total Tanin dan Nilai IC_{50}

Tabel 4. 7. Korelasi senyawa bioaktif dengan nilai IC₅₀

	Total Fenol	Total Flavonoid	Total Tanin	Nilai IC ₅₀
Total Fenol	1	0,953**	0,975**	-0,633**
Total Flavonoid	0,953**	1	0,980**	-0,570**
Total Tanin	0,975**	0,980**	1	-0,637**
Nilai IC₅₀	-0,633**	-0,57**	-0,637**	1

Ket : ** correlation is significant at the 0,01 level (2-tailed)

Tabel 4.7 menunjukkan bahwa masing-masing senyawa bioaktif memiliki tingkat korelasi yang berbeda-beda dengan nilai IC₅₀. Korelasi antara fenol dengan antioksidan adalah sebesar -0,633 sedangkan korelasi antara flavonoid serta tanin dengan nilai IC₅₀ berturut-turut adalah sebesar -0,570 dan -0,637. Korelasi Pearson Product Moment dilambangkan huruf “r”, dengan ketentuan nilai r tidak lebih dari harga ($-1 \leq r \leq +1$). Apabila $r = -1$ artinya korelasi negatif sempurna, $r = 0$ artinya tidak ada korelasi, dan $r = 1$ berarti korelasinya sempurna positif atau dengan kata lain, koefisien korelasi itu bergerak antara 0,000 sampai +1,000 atau diantara 0,000 sampai -1,000, tergantung kepada arah korelasi, positif atau negatif (Alimuddin, 2011). Koefisien yang bertanda positif menunjukkan arah korelasi yang positif. Koefisien yang bertanda negatif menunjukkan arah korelasi yang negatif. Sedang koefisien yang bernilai 0,000 menunjukkan tidak adanya korelasi antara X dan Y (Hadi, 2004). Interpretasi nilai r dapat dilihat pada **tabel 4.8**.

Tabel 4. 8. Interpretasi Nilai r

Interval Koefisien	Tingkat Hubungan
0,00 - 0,199	Sangat Rendah
0,20 - 0,339	Rendah
0,40 - 0,559	Cukup
0,60 - 0,779	Kuat
0,80 - 1,000	Sangat Kuat

Sumber: (Alimuddin, 2011)

Berdasarkan hasil uji pearson, hubungan antara fenol, flavonoid dan tanin dengan nilai IC_{50} menunjukkan adanya korelasi, dikarenakan semua nilai r yang didapat pada masing-masing senyawa bioaktif fenol, flavonoid dan tanin bernilai mendekati -1 yang menandakan adanya korelasi negatif antar dua variabel. Hasil uji pearson pada **tabel 4.7** dapat diasumsikan bahwa senyawa bioaktif yang paling berpengaruh terhadap nilai IC_{50} adalah total fenol karena nilai yang didapat lebih tinggi dibandingkan nilai total flavonoid dan total tanin.

Total fenol dan total tanin memiliki korelasi yang kuat dengan nilai IC_{50} berdasarkan tabel interpretasi nilai r karena total fenol memiliki nilai korelasi sebesar 0,633 dan total tanin sebesar 0,637 yang berada diantara rentang 0,60 - 0,779. Hal ini sesuai dengan Okawa (2001) yang menyatakan efek bioaktif senyawa antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki efek bioaktif adalah senyawa fenol yang memiliki gugus -OH dan -OR. Efek biologis seperti aktivitas antioksidan ditujukan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, peredam terbentuknya oksigen siglet serta pendonor electron. Sedangkan tanin merupakan salah satu golongan senyawa fenolik yang dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan fraksi lipid dan keaktifannya dalam penghambatan lipoksigenase (Zeuthen dan Sorensen, 2003). Berdasarkan literatur tersebut, maka diketahui bahwa fenol dan tanin memiliki hubungan yang kuat dengan nilai IC_{50} dan aktivitas antioksidan ekstrak kluwek.

Total flavonoid memiliki nilai korelasi terhadap nilai IC_{50} sebesar -0,570 yang berada diantara rentang nilai r 0,40 dan 0,559 yang berarti memiliki korelasi yang cukup dengan nilai IC_{50} . Senyawa flavonoid merupakan suatu senyawa metabolit sekunder kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan dalam (Lenny, 2006). Senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi peroksidasi lemak. Senyawa flavonoid akan menyumbangkan satu atom hidrogen untuk menstabilkan radikal peroksi lemak (Hamid *et al*, 2010). Sehingga senyawa flavonoid memiliki peranan terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak kluwek. Namun kurang murninya senyawa flavonoid dalam ekstrak dapat mengurangi tingkat korelasi, karena flavonoid banyak mengandung glikosida yang dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada flavonoid biasanya

naik dengan kenaikan jumlah gugus hidroksil dan penurunan glikosilasi (Shahidi & Ambigaipalan 2015).

Menurut Alimuddin (2011), jika kenaikan nilai variabel X selalu disertai kenaikan nilai variabel Y dan sebaliknya, turunnya nilai variabel X selalu diikuti oleh turunnya nilai variabel Y, maka hubungan seperti itu disebut hubungan yang positif. Sedangkan jika nilai variabel X yang tinggi selalu disertai oleh variabel Y yang rendah nilainya, dan sebaliknya, bilamana nilai variabel X yang rendah selalu diikuti oleh nilai variabel Y yang tinggi, hubungan antara kedua variabel itu disebut hubungan negatif. Hasil uji pearson didapatkan pada semua variabel X (fenol, flavonoid, tanin) bernilai negatif, yang berarti korelasi senyawa bioaktif dengan nilai IC_{50} menunjukkan adanya hubungan berbanding terbalik, dimana semakin meningkatnya kadar senyawa bioaktif maka nilai IC_{50} akan menurun atau dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan semakin meningkat.

4.8 Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik menggunakan metode *multiple attribute zelleny* (Zeleny, 1982). Parameter yang digunakan adalah rendemen, total fenol, total flavonoid, total tanin dan nilai IC_{50} . Parameter yang diharapkan memiliki nilai ideal maksimal adalah rendemen, total fenol, total flavonoid dan total tanin. Sedangkan parameter yang diharapkan memiliki nilai ideal minimal adalah nilai IC_{50} . Perlakuan dengan jarak kerapatan maksimal terkecil merupakan hasil perlakuan terbaik dari penelitian yang dilakukan (Lampiran 11). Hasil penentuan perlakuan terbaik ekstraksi kluwek perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi dapat dilihat pada **Tabel 4.9**.

Tabel 4. 9. Hasil Penentuan Perlakuan Terbaik Ekstraksi Kluwek

Perlakuan	L1	L2	Lmax	Jumlah	Peringkat
R1L1	0.264	0.017	0.672	0.954	3
R1L2	0.162	0.008	0.672	0.842	2
R1L3	0.020	0.000	0.672	0.693	1
R2L1	0.533	0.071	0.672	1.277	5
R2L2	0.490	0.060	0.672	1.222	6
R2L3	0.460	0.056	0.672	1.189	4
R3L1	0.644	0.104	0.672	1.421	8
R3L2	0.573	0.084	0.672	1.330	7
R3L3	0.672	0.256	0.672	1.601	9

Berdasarkan **Tabel 4.9** Menunjukkan bahwa hasil perlakuan terbaik di peroleh pada perlakuan rasio bahan:pelarut 1:5 dengan waktu 20 menit dengan nilai 0.693, nilai ini paling kecil jika dibandingkan dengan nilai perlakuan lainnya. Parameter pada ekstrak kluwek hasil perlakuan terbaik dibandingkan dengan kluwek segar yang sudah dianalisa pada awal penelitian. Nilai parameter uji pada perlakuan ekstrak kluwek dan kluwek segar dapat dilihat pada **Tabel 4.10**

Tabel 4. 10. Perbandingan Ekstrak Kasar Kluwek dengan Kluwek Segar

Parameter	Kluwek Segar	Ekstrak Kluwek
Total Fenol (mg GAE/g)	1,26 ± 0,12	3,90 ± 0,17
Total Flavonoid (mg QE/g)	0,12 ± 0,01	0,56 ± 0,02
Total Tanin (mg TAE/g)	1,35 ± 0,05	1,62 ± 0,05
Aktivitas Antioksidan (IC ₅₀)	60119,60 ± 3200,64	36228,99 ± 813,11

Berdasarkan **Tabel 4.10** total fenol pada ekstrak kluwek adalah sebesar 3,9 mg GAE/g. Nilai tersebut lebih besar dibandingkan dengan Kluwek segar yang memiliki nilai total fenol sebesar 1,26 mg GAE/g. Nilai total flavonoid dan total fenol yang didapat pada ekstrak kluwek juga lebih tinggi dibandingkan pada kluwek segar. Nilai total flavonoid pada ekstrak sebesar 0,56 mg QE/g dan pada kluwek segar hanya sebesar 0,12 mg QE/g. Sedangkan nilai total tanin yang didapatkan pada ekstrak kluwek sebesar 1,62 mg TAE/g dan pada kluwek segar sebesar 1,35 mg TAE/g. Hal ini dikarenakan pada ekstrak kluwek telah dilakukan proses ekstraksi yang merupakan teknik pemisahan untuk mendapatkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa-senyawa dari suatu sampel yang diinginkan (Leba, 2017). Oleh karena itu, komponen yang diinginkan seperti fenol, flavonoid dan tanin didapatkan lebih banyak pada ekstrak kluwek karena telah mengalami proses ekstraksi. Selain itu, metode ekstraksi yang digunakan adalah *microwave assisted extraction*. Metode ekstraksi ini menggunakan radiasi gelombang mikro yang akan memberikan panas pada air dalam sel sehingga air dalam sel akan menguap dan memberikan tekanan tinggi pada dinding sel yang mengakibatkan sel bahan menjadi bengkak (*swelling*). Tekanan tersebut akan

mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut (Mandal *et al.*, 2007). Rusaknya matrik bahan dapat mempermudah keluarnya senyawa-senyawa aktif dari dalam sel bahan ke pelarut di sekitarnya (Jain *et al.*, 2009), sehingga hasil ekstraksi semakin maksimal dan menyebabkan nilai total fenol, total flavonoid dan total tanin pada ekstrak lebih tinggi dibandingkan pada kluwek segar.

Nilai IC_{50} yang dihasilkan ekstrak kluwek lebih rendah dibandingkan dengan kluwek segar dimana ekstrak kluwek menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 36228,99 ppm sedangkan kluwek segar menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 60119,60. Hal tersebut dikarenakan adanya radiasi gelombang mikro pada saat proses Ekstraksi menggunakan MAE akan memberikan panas pada air dalam sel, sehingga air dalam sel akan menguap dan memberikan tekanan tinggi pada Dinding sel yang mengakibatkan sel bahan menjadi bengkak (*swelling*). Tekanan Tersebut akan mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut (Mandal, 2007). Rusaknya matrik bahan dapat mempermudah keluarnya senyawa-senyawa aktif dari dalam sel bahan ke pelarut di sekitarnya sehingga kluwek yang diekstrak menggunakan metode MAE memiliki kadar senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (Jain *et al.*, 2009).

Perlakuan lama waktu ekstraksi selama 20 menit menyebabkan aktivitas antioksidan yang dihasilkan akan semakin besar karena adanya kontak antara pelarut dengan bahan baku akan semakin lama. Kepolaran pelarut juga merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi sifat antioksidan yang diperoleh dimana suatu senyawa dapat menunjukkan kelarutan yang berbedabeda pada pelarut yang berbeda pula, bahan yang sama kepolarannya akan mudah larut dalam pelarut tersebut, dimana pada penelitian ini digunakan pelarut etanol (Renhoran, 2012). Kluwek segar dan ekstrak kluwek tergolong sebagai bahan pangan yang memiliki aktivitas antioksidan sangat lemah dimana nilai IC_{50} yang dihasilkan lebih dari 200 ppm, hal ini dikarenakan rendahnya kandungan senyawa bioaktif seperti fenol, flavonoid dan tanin yang berperan dalam menciptakan aktivitas antioksidan.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekstrak kasar kluwek diketahui memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil penelitian menunjukkan terjadi interaksi ($\alpha = 0,05$) pada perlakuan rasio bahan:pelarut dan lama waktu ekstraksi pada parameter rendemen, total fenol, total tanin dan nilai IC_{50} . Sedangkan untuk parameter total flavonoid tidak terdapat interaksi terhadap dua perlakuan, namun berbeda nyata ($\alpha = 0,05$) hanya pada perlakuan rasio bahan:pelarut. Hal ini diduga karena selisih waktu yang digunakan terlalu sedikit sehingga mengakibatkan hasil total flavonoid tidak jauh berbeda meskipun secara umum terjadi peningkatan total flavonoid seiring dengan meningkatnya waktu ekstraksi.
2. Uji korelasi antara komponen senyawa bioaktif pada ekstrak kluwek menunjukkan bahwa fenol dan tanin memiliki tingkat korelasi yang kuat nilai IC_{50} . Sedangkan flavonoid memiliki tingkat korelasi yang cukup kuat dengan nilai IC_{50} .
3. Hasil Uji Perlakuan terbaik dengan metode zeleny diperoleh kombinasi perlakuan rasio bahan:pelarut 1 : 5 dengan lama ekstraksi 20 menit (R1L3). Hasil rendemen sebesar 80,30%, total fenol 3,90 mg GAE/g ekstrak, total flavonoid 0,56 mg QE/g ekstrak, total tanin 1,62 mg TAE/g ekstrak dan aktivitas antioksidan IC_{50} sebesar 36228,99 ppm.
4. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kasar kluwek memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah ditandai dengan tingginya nilai IC_{50}

5.2 Saran

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan ekstrak kasar kluwek tanpa dilakukan pemekatan. Ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi metode MAE langsung diuji sesuai parameter uji. Peneliti juga tidak melakukan perlakuan pendahuluan seperti pengeringan kluwek sebelum diekstrak dan penghilangan berbagai senyawa yang mungkin akan mengganggu pada proses uji selanjutnya, seperti kandungan lemak. Selain itu, peneliti hanya menggunakan 3 variasi rasio

bahan:pelarut dan 3 variasi waktu ekstraksi, sehingga variasi rasio bahan:pelarut dan waktu ekstraksi yang didapat pada perlakuan terbaik diduga belum menginterpretasikan yang sebenarnya. Berdasarkan kekurangan tersebut, maka beberapa hal yang perlu dilakukan yaitu:

1. Perlu dilakukan ekstraksi kluwek metode Microwave Assisted Extraction (MAE) dengan perlakuan yang berbeda seperti jenis pelarut, konsentrasi pelarut, daya *microwave* dan suhu ekstraksi
2. Perlu dilakukan perlakuan pendahuluan sebelum proses ekstraksi yang lebih lengkap seperti proses pengeringan kluwek dan penghilangan kandungan lemak dalam kluwek agar tidak mengganggu proses ekstraksi dan uji
3. Perlu dilakukan optimasi pada variasi rasio bahan:pelarut dan waktu ekstraksi lebih lanjut
4. Perlu dilakukan identifikasi pada komponen senyawa bioaktif lebih lanjut menggunakan HPLC agar dapat mengetahui komponen senyawa bioaktif yang lebih lengkap

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin. 2011. **Hubungan Kegiatan Regular Meeting dan Kepuasan Komunikasi Karyawan (Pt. Infomedia Nusantara Surabaya Tbk- Yellow Pages Sales Operation)**. Skripsi. Institut Agama Islam Negeri Sunan Ampel. Surabaya
- Andarwulan, N., Fardiaz, S., Apriyanto, A., Hariyadi, P., Shetty, K. 1999. **Mobilization of primary metabolites and phenolics during natural fermentation in seeds of *Pangium edule* Reinw.** Process Biochemistry 35:197–204
- Anwar, E. 1992. **Isolasi Antioksidan dari Biji Picung (*Pangium edule* Reinw) Terfermentasi**. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- AOAC International. 1997. **Method 989.05 in Official Methods of Analysis**. AOAC International, Arlington
- Apak. 2007. **Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay**. Molecules. 12:1496-1547
- Aprianti, D. 2011. **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Picung (*Pangium edule* Reinw.) dan Pengaruhnya terhadap Stabilitas Fisiko Kimia, Mikrobiologi dan Sensori Ikan Kembung (*Rastrelliger neglectus*)**. Skripsi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta
- Arini, D. I. D. 2012. **Potensi Pangi (*Pangium edule* Reinw.) Sebagai Bahan Pengawet Alami dan Prospek Pengembangannya di Sulawesi utara**. Info BPK Manado 2(2): 103 -113
- Artati, Kriswiyanti, E., dan Fadilah. 2007. **Pengaruh Kecepatan Putar Pengadukan dan Suhu Operasi pada Ekstraksi Tanin dari Jambu Mete dengan Pelarut Aseton**. Ekuilibrium 6(1): 33-38
- Astawan, M. dan Kasih, A.L. 2008. **Khasiat Warna-Warni Makanan**. Gramedia. Jakarta
- Aulia, L.P., Widjanarko, S.B. 2008. **Optimasi Proses Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata* L) Metode MAE dengan Respon Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol**. Jurnal agroindustri halal 4(1)

- Azmi, A.N dan Yunianta. 2015. **Ekstraksi Antosianin Dari Buah Murbei (*Morus alba. L*) Metode Microwave Assisted Extraction (Kajian Waktu Ekstraksi Dan Rasio Bahan: Pelarut).** Jurnal Teknologi Pangan dan Agroindustri 3(3): 835-846
- Barbero, G, F, Palma, M, Barroso, C, G. 2006. **Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Analytica Chimica Acta* 578(2):227-233
- Berk, Z. 2009. **Food Process Engineering and Technology Third Edition.** Elsevier Inc. New York
- Bhadoriya, U., Tiwari, S., Mourya, M. and Ghule, S. 2011. **Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids From Zanthoxylum Budrunga W. Optimization Of Extraction Process.** Asian Journal of Pharmacy and Life Science 1(1)
- Cahyadi, W. 2006. **Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan.** Bumi Aksara. Jakarta
- Calinescu, I., Ciuculescu, C., Popescu, M., Bajenaru, S., and Epure, G. 2001. **Microwave Assisted Extraction of Active Principles from Vegetal Material.** Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering 12: 1-6
- Chan, C., Yusoff, R., Ngoh, G. and Kung F.W. 2011. **Microwave Assisted Extractions of Active Ingredients from Plants.** Journal of Chromatography 1218(37): 6213-6225
- Darwis, D. 2000. **Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati. Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati.** Universitas Andalas. Semarang
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., dan Sarker, S.D. 2012. **Microwave Assisted Extraction in Natural Products Isolation.** Springer Science. New York
- Desmiaty, Y., Ratih, H., Dewi, M.A. dan Agustin, R. 2008. **Penentuan Jumlah Tanin Total pada Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lamk*) dan Daun Sambang Darah (*Excoecaria bicolor Hassk.*) Secara Kolorimetri dengan Pereaksi Biru Prusia.** *Ortocarpus* 8, 106-109

- Eka, C., Florentina, P. 2017. **Ekstraksi Tanin dari Kulit Kayu Pinus dengan Bantuan Microwave: Pengaruh Daya Microwave, Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi.** 6(4): 155-161
- Erliyanti, N.K., Rosyidah, E. 2007. **Pengaruh Daya Microwave Terhadap Yield Pada Ekstraksi Minyak Atsiri dari Bunga Kamboja (*Plumeria alba*) Menggunakan Metode *Microwave Hydrodistillation*.** Jurnal Rekayasa Mesin 8(3): 175-178
- Eskilsson, C.S, Bjorklund, E. 2000. **Analytical-scale Microwave Assisted Extraction.** Journal of Chromatography 902: 227-250
- Estiasih, T. dan Sofia, E. 2009. **Stabilitas Antioksidan Bubuk Keluwak. (Paangilum Edule Reinw.) Selama Pengeringan dan Pemasakan.** Jurnal Teknologi Pertanian 10(2)
- Farida, R 2015 **Antiosianin Extraction of Mangosteen Waste Using Microwave Assisted Extraction.** Journal of Pangan Dan Agroindustri 3(2): 362-373
- Fengel, D. dan Wegener, G. 1995. **Kayu: Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi.** Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Frindryani, L. 2016. **Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Dalam Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia Pandurata*) dengan Metode DPPH.** Skripsi. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta
- Gardjito, Murdijati. 2013. **Bumbu, Penyedap dan Penyerta Masakan Indonesia.** P.T Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Gritter, R.J. 1991. **Pengantar Kromatografi edisi kedua.** ITB Press. Bandung
- Hadi, Sutrisno. 2004. **Statistik (jilid 2).** Yogyakarta: Penerbit Andi
- Hagerman, A.E. 2002. **Tannin Handbook.** Department of Chemistry and Biochemistry Miami University
- Halliwell, B. And Gutteridge J.M.C. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3th Ed.. Oxford University Press Inc. New York
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1990. **Role of free radical and catalytic logam ions in humans disease : An overview.** Meth. Enzymol 186: 1-83
- Haris, M. 2011. **Penentuan Kadar Flavanoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Dari Daun Dewa (*Gynura pseudochina* [Lour] DC) Dengan spektrofotometer UV-Visibel.** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang

- Hariyati, M. N. 2006. **Ekstraksi Dan Karakterisasi Pektin dari Limbah Proses Pengolahan Jeruk Pontianak (*Citrus nobilis* var *microcarpa*)**. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Hariyatmi. 2004. **Kemampuan Vitamin E sebagai antioksidan terhadap Radikal Bebas pada Lanjut Usia**. Jurnal MIPA 14(1): 52-60
- Heriyanto, N.M. dan Subiandono, E. 2008. **Ekologi Pohon Kluwek/Pakem (*Pangium edule* Reinw.) di Taman Nasional Meru Betiri, Jawa Timur**. Buletin Plasma Nutfah 14(1): 33-42
- Hidayat, S. dan Napitupulu, R.M. 2015. **Kitab Tumbuhan Obat**. Penebar Swadaya Grup. Jakarta Timur
- Ingrid H.M. dan Santosa, H. 2014. **Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*)**. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Katolik Parahyangan. Bandung
- Iriany, Pandiangan, F. dan Eka, C. 2017. **Ekstraksi Tanin dari Kulit Kayu Akasia dengan Menggunakan Microwave: Pengaruh Daya Microwave, Waktu Ekstraksi dan Jenis Pelarut**. Jurnal Teknik Kimia 6(3)
- Jain, V., Tripti , Pandey, R., Vyas, A. dan Sukhla, S.S. 2009. **Microwave Assisted Extraction for Phytoconstituents An-Overview**. Asian Jurnal Research Chemistry 1 : 19-25
- Jayanudin, Ayu Zakiah Lestari, dan Feni Nurbayanti, 2014. **Pengaruh suhu dan rasio pelarut ekstraksi terhadap rendemen dan viskositas natrium alginat dari rumput laut coklat (*Sargassum* sp)**. Jurnal Integrasi Proses 5(1): 51-55
- Jun, M.H., Yu, J., Fong, X., Wan, C.S., Yang, C. T. and Ho. 2003. **Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones From Kudzu Root (*Pueraria labata Ohwi*)**. Journal Food Science 68:21
- Kamaluddin, M.H., Lutfi, M., dan Hendrawan, Y. 2014. **Analisa Pengaruh Microwave Assisted Extraction (MAE) Terhadap Ekstraksi Senyawa Antioksidan Catechin Pada Daun Teh Hijau (*Camellia Sinensis*)**. Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem 2(2)
- Kantangkul, T., Siripongvutikorn, S. Sae-wong, C. 2015. **A Study of The Antioxidant and Anti-Inflamantory Properties of Thai Yellow Curry**

- (Keang-hleung) Paste With Finger Chili and Bird Chili and Its Comsumer Acceptability.** IFRJ 22(2): 625-630
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. and Soyer, Y. 2005. **Antioxidant activity of selected fruits and vegetable grown in Turkey.** Journal Agriculture. 29: 297-303
- Ketaren, S. 1986. **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan.** UI Press. Jakarta
- Khopkar, S.M. 2008. **Konsep Dasar Kimia Analitik.** UI Press. Jakarta
- Kumalaningsih, S. 2006. **Antioksidan Alami.** Trubus Agrisarana. Surabaya
- Kurniasari, L. 2008. **Kajian Ekstraksi Minyak Jahe menggunakan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE).** Momentum 4(2): 47-52
- Kusumaningtyas, E., Widiati, R. dan Gholib, D. 2008. **Uji daya hambat ekstrak dan krim ekstrak daun sirih (Piper betle) terhadap C. albicans dan Trichophyton mentagrophytes.** Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Yogyakarta
- Kyrstyna, P. dan Anna, P. 2013. **Application of Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) to Estimate the Antioxidant Capacity of Food Samples.** Anal Mehods 5 : 42-88
- Langat, M. K. 2011. **Chemical Constituents of East European Forest Species. In A. f. Standards, Book of Extended Extracts.** Napreca. Kenya
- Leba, M.A.U. 2017. **Buku Ajar Ekstraksi dan Real Kromatografi.** Deepublish Publisher. Yogyakarta
- Lenny, S. 2006. **Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan alkaloida.** Universitas Sumatera Utara. Medan
- Li, S., R., Zhu, M., Zhong. 2010. **Effects of Ultrasonic-Assistant Extraction Parameters on Total Flavones Yield of Selaginella Doederleinii and Its Antioxidant Activity.** Journal of medicinal plants research 4(17):1743-1750
- Liem, Z . 2013. **Kandungan Proksimat dan Aktivitas Antioksidan Rumput Laut Merah (Euchema cottonii) di Perairan Kupang Barat.** Skripsi. Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga
- Makagansa, C., Mamuaja, C.F., Mandey, L.C. 2015. **Kajian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Pangi (Pangium edule Reinw) Terhadap Staphylococcus Aureus, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa**

- dan Escherichia coli Secara In Vitro.** Jurnal Ilmu dan Teknologi pangan 3(1): 16-25
- Mandal, V., Mohan, Y., dan Hemalatha, S. 2007. **Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research.** Pharmacognosy Reviews 1(1)
- Maslarova, N.V., Yanishlieva. 2001. **Inhibiting Oxidation.** Dalam Jan Pokorny Nedyaltika Yanislieva dan Michael Gordon: Antioxidant in Food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited. Cambridge: 22-70
- Molyneux, P. 2004. **The Use of The Stable Free Radikal Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity.** Journal Science of Technology 26(2):211-219
- Muchtadi, D. 2009. **Sayuran-Sayuran Sumber Serat dan Antioksidan Mencegah Penyakit Degeneratif.** Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor
- Nisa, Z. 2013. **Bioper (*Bio-Pangium edulis Reinw.*) : Insektisida Nabati Pembasmi Hama yang Praktis, Ekonomis dan Ramah Lingkungan.** Universitas Negeri Semarang. Semarang
- Oematan, Z.Z.B. 2015. **Pengaruh Perbedaan Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Tanin Pada Ekstrak Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale L.*).** Jurnal Ilmiah 4(2)
- Okawa, M, Kinjo, J., Nohara, T., and Ono, M. 2001. **DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants, Biol. Pharm Bull. 24 (10): 1202-1205**
- Panghegar, H. 1990. **Isolasi Komponen Antioksidan Alami dari Biji Picung (*Pangium edule Reinw.*).** Skripsi. IPB. Bogor
- Permatasari, E. 2011. **Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif pada Selada Air (*Nasturtium officinale L. R. Br.*).** Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Perreux, L. and Loupy, A. 2001. **A Tentative Rationalization of Microwave Effects in Organic Synthesis According to The Reaction Medium and Mechanistic Considerations.** Elsevier Science Ltd. France
- Pokorny, J. 1991. **Natural antioxidants for food use.** Trends in Food Science and Technology 2: 223-227
- Prakash, A. 2001. **Antioxidant Activity. Medallion Laboratories-Analytical Progress.** 19(2):1-4

- Quoc, L.P.T. 2014. **Optimization of The Pectin Extraction from Pomelo Peels by Oxalic Acid and Microwave**. Banat's Journal of Biotechnology 9:67
- Ratty, A.K. 1998. **Effect of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure Activity Relationship**. Biochem Med Metabol Biol. 39: 67-69
- Renhoran, M. 2012. **Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak *Sargassum polycystum***. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W.R., Utami, R. dan Mulatsih, W. 2010. **Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavaonoid of Extracts and Fractions of Red Fruit (*Padanus conoideus* Lam)**. International Food Research Journal 17, 97-106
- Salas, P.G., Aranzazu, M.S., Antonio, S.C., Alberto, F.G.. 2010. **Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples**. Molecules 15: 8813-8826
- Samudry, E.G., Sukainah, A. , Mustrarin A. 2017. **Analisis Kualitas Kluwek (*Pangium edule Reinw*) Hasil Fermentasi Menggunakan Media Tanah dan Abu Sekam**. Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian 3: 25-33
- Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., and Gonzalez-Paramas, A.M.. 2012. **Extraction and Isolation of Phenolic Compounds in Methods in Molecular Biology, vol. 864**. Springer Science. New York
- Saputra, T.K. 2001. **Potensi Daging Biji Picung (*Pangium edule Reinw*) sebagai Fungisida Botani terhadap *Fusarium solani* secara In vitro**. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Sasikumar, J.M. 2009. **In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Extracs of *Berberis tinctoria* Lesch. Root and Root Bark**. Journal of Herbal and Toxicology 3(2): 53-58
- Setyawan, A. 2004. **Pemisahan Senyawa Aktif Daging Biji Picung (*Pangium edule Reinw*) dan uji aktivitas Biologis terhadap Ulat Grayak (*Spodopteralitura F.*)**. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015. **Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review**. J Func Foods 18:820-897
- Shahwar, D., Shafiq-ur-Rehman, Ahmad, N., Ullah, S., and Raza, M.A. 2010. **Antioxidant activities of the selected plants from the family**

- Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae.** Afr J Biotech 9(7):1086- 1096
- Shinta, Endro & Anjani P. (2008). **Pengaruh Konsentrasi Alkohol dan Waktu Ekstraksi Terhadap Ekstraksi Tannin dan Natrium Bisulfit dari Kulit Buah Manggis.** Makalah Seminar Nasional 31-34
- Sibuea, F.S.Y. 2015. **Ekstraksi Tanin dari Kluwek (*Pangium Edule R.*) Menggunakan Pelarut Etanol dan Akuades dan Aplikasinya Sebagai Pewarna Makanan.** Tugas Akhir. Semarang
- Sjahid, L.R. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*).** Universitas Muhammadiyah. Surakarta
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. dan Ameida, L.M. 1997. **Antioxidant activity of some extract of thymus zygis.** Free Rad 26: 469-478
- Sudarmadji, S., B. Haryono., dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian.** Liberty. Yogyakarta
- Sukardi, Mulyarto, A.R., Safera, W. 2007. **Optimasi Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Tanin Pada Bubuk Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium folium*) Serta Biaya Produksinya.** Skripsi. Universitas Brawijaya Malang
- Sukaryo. 2016. **Pengaruh Waktu Ekstraksi dalam Pengambilan Tanin dari Kluwek (*Pangium edule Reinw*) Menggunakan Pelarut Etanol 70 %.** Jurnal Neo Teknika 2(2): 37-40
- Sulistianingsih, M., Jati, W.N., Zahida, F. **Uji Toksisitas Ekstrak Biji Kluwak (*Pangium edule Reinw.*) Sebagai Moluskisida Keong Mas (*Pomacea Caniculata* Lamarck, 1804.) Pada Tanaman Padi.** Skripsi. Universitas Atmajaya. Yogyakarta
- Supriadi. 2002. **Optimalisasi Ekstraksi Komponen Bioaktif Daun Tebat Barito (*Ficus deltoidea*).** Skripsi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Suryanto, E. dan Wehantouw. 2009. **Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis F.*).** Jurnal Kimia 2(1)
- Takahama, U. 2004. **Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions.** *Phytochemistry Reviews*. 3(1-2):207-219
- Ulinuha, A.Y. 2014. **Ekstraksi Pektin Kulit Buah Naga (Dragon fruit) dan Aplikasinya sebagai Edible Film.** Universitas Negeri Semarang. Semarang

- Vermerris, W. and Nicholson, R.L. 2006. **Phenolic Compound Biochemistry**. Springer. Netherlands
- Waghorn, G.C. and McNabb, W.C. 2003. **Consequences of Plant Phenolic Compounds for Productivity and Health of Ruminants**. Proc. Nutr. Soc. 62: 383-392
- Waji, R., Agestia dan S. Andis. 2009. **Flavonoid (Kuersetin): Makalah Kimia Organik Bahan Alam**. Universitas Hasanudin. Makassar
- Wang, S., Chen F., Wu J., Wang Z., dan Hu X. 2008. **Optimization of Pectin Extraction Assisted by Microwave from Apple Pomace**. Journal of Food Engineering 78: 693-700
- Westendarp, H. 2006. **Effects of Tannins in Animal Nutrition**, Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 113: 264-268
- Widjaya, C.H. 2003. **Peran Antioksidan Terhadap Kesehatan Tubuh**. Edisi IV. Healthy Choice. Jakarta
- Widoretno, D.R., Kunhermanti, D., Mahfud, Qadariyah, L. 2016. Ekstraksi Kayu Nangka (*Artocarpus heterophyllus lam*). Jurnal Teknik 5(2): 2337-3539
- Winarno, F.G. 1991. **Kimia Pangan dan Gizi**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Wulandari, D. 2011. **Informasi Singkat Benih No.124**. BPTH Sulawesi. Makassar
- Xiao, X., Wei, S., Jiayue, W., dan Gongke, L. 2012. **Microwave-Assisted Extraction Performed in Low Temperature and in Vacuo for the Extraction of Labile Compounds in Food Samples**. Analitica Chimica Acta 712 : 83-93
- Yulianti, D., Susilo, B., Yulianingsih, R. 2014. **Pengaruh Lama Ekstraksi dan Konsentrasi Pelarut Etanol Terhadap Sifat Fisika-Kimia Ekstrak Daun Stevia dengan Metode Microwave Assisted Extraction**. Jurnal Bioproses Komoditas Tropis 2(1)
- Yuningsih dan Kartina, G. 2007. **Efektivitas Ekstrak Biji Picung (*Pangium edule Reinw.*) Terhadap Mortalitas keong mas (*Pomacea canaliculata Lamarck*)**. Berita Biologi 8(4): 307-310
- Yunita, F.C. 2004. **Ekstraksi Daging Biji Picung (*Pangium edule Reinw.*) dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* leach**. Skripsi. IPB. Bogor
- Zeleny, M. 1982. **Multiple Criteria Decision Making, 2nd Edition**. McGraw Hill. New York

- Zeuthen P. dan Sorensen L. 2003. **Food Preservation Woodhead Publishing Limited and CRC. Press LLC. Germany**
- Zhang, H., Yang, X., and Y. Wang. 2011. **Microwave Assisted Extraction of Secondary Metabolites From Plants: Current Status and Future Directions.** *Trends in Food Science & Technology* 22 : 672 – 688